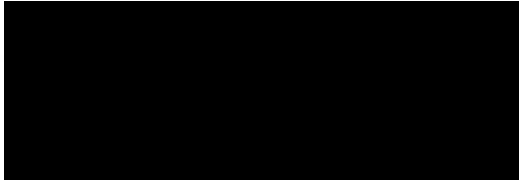




Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproe
ven.nl

T 0900 2800028 (10 ct/min)
wob-ccd@rvo.nl

Onze referentie
W17-08

Uw referentie
Maart2017

Briefkenmerk
CCD-2017-320

Datum **19 FEB 2018**
Betreft Wob-besluit W17-08

Geachte mevrouw 

In uw e-mail van 18 april 2017 heeft u met een beroep op de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: Wob) bij de Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzocht om informatie met betrekking tot de projectvergunningen die de CCD in de maand maart 2017 heeft afgegeven. Tevens heeft u verzocht om alle correspondentie, adviezen en besluiten over deze aanvragen.

Uw verzoek is door de CCD behandeld onder het kenmerk W17-08 en in deze brief vindt u het besluit op uw verzoek. Hieronder volgt nu eerst een overzicht van het procesverloop.

Procesverloop

- Bij e-mail van 18 april 2017 heeft u met een beroep op de Wob verzocht om informatie met betrekking tot de projectvergunningen die de CCD in de maand maart 2017 heeft afgegeven en alle correspondentie, adviezen en besluiten over de aanvragen;
- De ontvangst van uw verzoek is bij brief van 24 april 2017 (per e-mail verzonden) aan u bevestigd;
- Bij brief van 10 mei 2017 (per e-mail verzonden) heeft de CCD de beslistermijn met vier weken verdaagd;
- Bij brief van 16 mei 2017 (per e-mail verzonden) heeft de CCD de beslistermijn opgeschort tot de datum waarop door de betrokken derden een zienswijze naar voren is gebracht of de daarvoor gestelde termijn ongebruikt is verstreken;
- Bij brief van 13 juni 2017 (per e-mail verzonden) heeft de CCD u laten weten dat twee van de belanghebbenden een aanvullende termijn hebben gevraagd voor het aanleveren van een zienswijze. De CCD heeft een nadere termijn van 2 weken – gerekend vanaf 13 juni 2017 – verleend;

- De laatste zienswijze is op 27 juni 2017 ontvangen. Hierdoor is de uiterste beslistermijn verschoven naar 25 juli 2017;
- Bij brief van 25 juli 2017 (verzonden per email) heeft de CCD u op de hoogte gebracht van de stand van zaken met betrekking tot de behandeling van uw Wob-verzoek.

Wettelijk kader

Uw verzoek valt (deels) onder de reikwijdte van de Wob.

Inventarisatie documenten

Op basis van uw verzoek zijn verscheidene documenten aangetroffen. De documenten zijn per projectvergunning genummerd en opgenomen in een bijbehorende inventarislijst, waarin per document wordt aangegeven of het document geheel wordt geopenbaard, gedeeltelijk wordt geopenbaard of volledig wordt geweigerd. Hierbij worden tevens de wettelijke weigeringsgronden aangegeven. De inventarislijsten worden als onderdeel van dit besluit bijgevoegd en maken onderdeel uit van de (eventueel) te openbaren documenten. Onder uw verzoek vallen 20 projectvergunningen.

Reeds openbare documenten

Van iedere verleende vergunning wordt een Niet Technische Samenvatting (hierna: NTS) op de website van de CCD (www.centralecommissiedierproeven.nl) gepubliceerd. Deze informatie is daarmee reeds openbaar. Per projectvergunning staat in de inventarislijst aangegeven welk document de NTS betreft. De Wob is niet van toepassing op informatie die reeds openbaar is, waardoor uw verzoek voor wat betreft deze documenten niet onder de reikwijdte van de Wob valt.

Aanvullend kunnen wij aangeven dat de data van vergaderingen van de CCD reeds openbaar zijn middels de verslagen van de vergaderingen van de CCD. Deze verslagen zijn eenvoudig te vinden op de website van de CCD, via (onder andere) de zoekterm 'verslag'. Voor wat betreft deze data valt uw verzoek ook niet onder de reikwijdte van de Wob.

Zienswijzen

Bij de openbaarmaking van de documenten zijn derde belanghebbenden betrokken. Zij zijn in de gelegenheid gesteld om over de eventuele openbaarmaking van de documenten een zienswijze te geven. De ingediende zienswijzen spelen een belangrijke rol in de afweging van de betrokken belangen van de verzoeker van de documenten versus derde belanghebbenden. De ingediende zienswijzen zijn meegenomen bij de behandeling van dit besluit.

Besluit

Hierbij besluit de CCD een deel van de door u gevraagde informatie te openbaren. Voor het overige wordt de door u gevraagde informatie niet openbaar gemaakt. Voor de motivering verwijzen wij u naar de overwegingen in dit besluit en de bijgevoegde inventarislijsten per vergunning.

Overwegingen

Op grond van artikel 3, vijfde lid van de Wob wordt een verzoek om informatie ingewilligd met inachtneming van hetgeen is bepaald in de artikelen 10 en 11 van de Wob.



Het recht op openbaarmaking op grond van de Wob dient uitsluitend het publieke belang van een goede en democratische bestuursvoering. Het komt iedere burger in gelijke mate toe. Daarom kan ten aanzien van de openbaarheid geen onderscheid worden gemaakt naar gelang de persoon of de bedoeling of belangen van de verzoeker. Bij de te verrichten belangenafweging worden dan ook betrokken het algemene belang bij openbaarmaking van de gevraagde informatie en de door de weigeringsgronden te beschermen belangen, maar niet het specifieke belang van de verzoeker.

Evenmin kent de Wob een beperkte vorm van openbaarmaking. Dit betekent dat openbaarmaking van de gevraagde documenten uitsluitend aan u op grond van de Wob niet mogelijk is. Indien wij u de betreffende documenten verstrekken, moeten wij deze ook aan anderen geven indien zij daarom verzoeken. In dat licht vinden de onderstaande belangenafwegingen dan ook plaats.

Wod versus Wob

Door enkele derde belanghebbenden is aangegeven dat de NTS volstaat voor wat betreft de openbaarmaking van de bij de vergunningen behorende documenten. Door de derde belanghebbenden is verwezen naar artikel 43 van de Europese Richtlijn 2010/63/EU (hierna: de richtlijn). Dit artikel schrijft voor welke gegevens de NTS bevat en welke niet. Deze bepaling is vrijwel letterlijk geïmplementeerd in de Wod (artikel 10a lid 5), het Dierproevenbesluit (artikel 3) en de Dierproevenregeling (artikel 4). Er zijn geen aanwijzingen dat Nederlandse wet- en regelgeving op dit onderdeel ruimer is dan de richtlijn voorschrijft.

Met de publicatie van de NTS is niet beoogd tevens te voorzien in een bijzondere openbaarmakingsregeling. Daarnaast volgt uit de parlementaire geschiedenis van de Wod¹ dat de Wob geen bijzondere openbaarmakingsregeling is. Dit is bevestigd in de uitspraak van de rechtbank Gelderland 21 april 2016 (kenmerk 15/6463). De Wob is daarmee volledig van toepassing op de behandeling van het voorliggende Wob-verzoek. De CCD heeft naar aanleiding van het bovenstaande in haar vergadering van 15 juli 2016 besloten dat de Wob (volledig) van toepassing is en niet verder gaat dan de richtlijn.

Aanvullend merkt de CCD op dat met het verstrekken van de NTS niet volledig wordt tegemoetgekomen aan het Wob-verzoek. Uit het Wob-verzoek volgt dat wordt verzocht om aanvragen van projectvergunningen met alle correspondentie, adviezen en besluiten hierover. Gelet op artikel 3 lid 5 van de Wob dient de CCD de informatie uit de genoemde dossiers openbaar te maken, tenzij daarvan op grond van de in artikel 10 en 11 van de Wob opgenomen weigeringsgronden of beperkingen kan worden afgezien. Ingevolge artikel 7 lid 2 van de Wob kan het verstrekken van de verlangde informatie in een andere dan door de verzoeker gewenste vorm (bijvoorbeeld in de vorm van een samenvatting) slechts in het tweede lid omschreven situatie aanvaardbaar zijn. Niet is komen vast te staan dat er sprake is van een dergelijke situatie. Met het enkel verstrekken van de NTS wordt derhalve niet volledig aan het Wob-verzoek tegemoet gekomen.

¹ Tweede Kamer, vergaderjaar 2013-2014, 33 692, nr. 24, blz. 4, 13 en 20, Eerste Kamer, vergaderjaar 2013-2014, 33 692, nr. D, blz. 8, Tweede Kamer, vergaderjaar 2012-2013, 33 692, nr. 3, blz. 12, 14 en 17, Tweede Kamer, vergaderjaar 1986-1987, 19 859, nr. 2, blz. 19 en 23.

Op grond van vorenstaande kan de CCD de mening van derde belanghebbenden, dat de Wob niet van toepassing is, dan wel dat op grond van de richtlijn ook achterliggende documenten slechts anoniem openbaar mogen worden gemaakt, niet delen.

Bedrijfs- en fabricagegegevens

Artikel 10 lid 1 aanhef en onder c van de Wob bepaalt dat het verstrekken van informatie achterwege blijft voor zover dit bedrijfs- en fabricagegegevens betreft, die door natuurlijke personen of rechtspersonen vertrouwelijk aan de overheid zijn medegedeeld.

Inzichtelijk dient te zijn dat de in de stukken neergelegde informatie, afzonderlijk en in onderlinge samenhang beschouwd, is aan te merken als concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie, waarvan openbaarmaking leidt tot wetenswaardigheden met betrekking tot de technische bedrijfsvoering of het productieproces, dan wel met betrekking tot de afzet van de producten of de kring van afnemers en leveranciers. Het betreffende artikel dient naar zijn aard restrictief te worden uitgelegd. De ingediende zienswijzen van derde belanghebbenden spelen een belangrijke rol in de afweging van de betrokken belangen van de verzoeker van de documenten versus derde belanghebbenden.

Het slechts verwijzen naar het gegeven dat de informatie vertrouwelijk aan de overheid zou zijn verstrekt is onvoldoende voor een beroep op voornoemde weigeringsgrond. Dat openbaarmaking van de krachtens deze weigeringsgrond geweigerde informatie een inzicht zou geven in de bedrijfsvoering van het bedrijf is onvoldoende voor het oordeel dat het om vertrouwelijke bedrijfs- en fabricagegegevens gaat. Voor het bovenstaande wordt verwezen naar de uitspraken van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State (hierna: de Raad van State) van 23 december 2015 (ECLI:NL:RVS:2015:3976), 20 november 2013 (ECLI:NL:RVS:2013:2004) en 17 juli 2013 (ECLI:NL:RVS:2013:288).

De vergunninghouders van de vergunningen 2016690, 2016793, 2017808, 2017817, 2017829, 2017854, 2017865, 2017872 en 2017873 hebben aangegeven dat uit enkele gelakte delen van de betrokken documenten de onderzoeksstrategie voor de komende jaren blijkt. De stukken zijn vertrouwelijk aan de CCD verstrekt en de informatie is zeer concurrentiegevoelig. De onderzoeksstrategie behelst het meest essentiële deel van de bedrijfsvoering en het productieproces van een onderzoek.

De CCD verwijst naar aanleiding van het bovenstaande naar de uitspraak van de rechtbank Noord-Nederland van 16 oktober 2015 (ECLI:NL:RBNNE:2015:4811), waaruit volgt dat een beoogde onderzoeksstrategie kan worden aangemerkt als bedrijfs- en fabricagegegevens. Indien deze informatie openbaar gemaakt zou worden, biedt dat concurrenten de mogelijkheid inzicht te krijgen in deze strategie, als gevolg waarvan de belangen van vergunninghouders onevenredig worden geschaad, mede vanwege het innovatieve karakter van de onderzoeken. Niet alle vergunninghouders hebben echter concreet aangegeven welke gegevens het specifiek betreft. Bij verschillende vergunningen dienden voorts uiteindelijk geen gegevens te worden geweigerd op grond van het zijn van bedrijfs- en fabricagegegevens. Hieronder zal op enkele ingediende zienswijzen – waarbij een



beroep is gedaan op de weigeringsgrond 'bedrijfs- en fabricagegegevens' – nader worden ingegaan.

De vergunninghouder bij vergunning 2016690 heeft aangegeven dat op slechts twee plaatsen in het projectvoorstel het soort te onderzoeken cellen dient te worden geweigerd. De vergunninghouder heeft aangegeven dat er primair sprake is van bedrijfs- en fabricagegegevens. Subsidiair is tevens sprake van concurrentiegevoelige informatie. De CCD is van oordeel dat geen sprake is van bedrijfs- en fabricagegegevens, maar wel van concurrentiegevoelige informatie. Onder het kopje 'concurrentiegevoelige informatie' zal dit worden gemotiveerd.

Voor wat betreft vergunning 2016779 is door de vergunninghouder aangegeven dat bepaalde informatie is aan te merken als bedrijfs- en fabricagegegevens. De in de zienswijze gebruikte bewoordingen en omschrijvingen zijn echter dermate vrijblijvend dat het voor de CCD niet is te beoordelen of de beschreven situaties zich ook in deze vergunning voordoen.

De vergunninghouder bij vergunning 2017817 heeft aangegeven dat informatie omtrent sub-aantallen dieren bedrijfsgevoelige informatie is, omdat hieruit indirect turnover en dus ook omzetgegevens zijn af te leiden. Het aantal dieren per onderdeel is vertrouwelijke informatie. Concurrenten kunnen deze informatie gebruiken voor een eigen onderzoeksstrategie in een vergelijkbare of identieke situatie.

De CCD is van oordeel dat in vergunning 2017817 sub-aantallen moeten worden geweigerd, omdat uit de gekozen aantallen de gevolgde lijn van de onderzoeker blijkt. Het gebruikte aantal dieren per groep is essentieel voor het verdere verloop en de uitkomsten van het onderzoek. Aantallen dieren, aantallen groepen en overlevingstijd betreffen bewuste keuzes van de onderzoekers, welke kenmerkend kunnen zijn voor het onderzoek en daarmee interessant voor concurrenten. Niet slechts concurrenten in Nederland, maar met name internationale concurrenten beschikken over de capaciteit en middelen om eenzelfde onderzoek te verrichten. Totaalaantallen dieren zijn reeds openbaar middels de NTS.

De vergunninghouder bij vergunning 2017817 heeft voorts in de zienswijze aangegeven dat er sprake is van zeer concurrentiegevoelig onderzoek. Er is aangegeven dat het informatie over bedrijfsvoering en gebruikte methoden en middelen betreft, die zeer concurrentiegevoelig is. De CCD is van oordeel dat aannemelijk is gemaakt dat uit de documenten informatie kan worden afgeleid omtrent de technische bedrijfsvoering, het productieproces, de afzet van producten en/of de kring van afnemers en leveranciers. Wanneer deze informatie openbaar wordt gemaakt, wordt inbreuk gemaakt op de kennis en handelswijze van vergunninghouder. De geweigerde informatie geeft inzicht in de fase waarin het onderzoek zich bevindt. Hieruit kan worden opgemaakt uit welke stappen het onderzoek bestaat en hoe de vergunninghouder tot de keuze van die stappen is gekomen. Dit geeft inzicht in de afwegingen van vergunninghouder op belangrijke beslispunten en in de wijze van het productieproces. De CCD verwijst naar de uitspraak van de rechtbank Noord-Nederland van 16 oktober 2015 (ECLI:NL:RBNNE:2015:4811), waaruit volgt dat de beoogde onderzoeksopzet terecht is aangemerkt als bedrijfs- en fabricagegegevens. Slechts die woorden of tekstdelen die inzicht geven in het voornoemde zijn geweigerd.

De bij de vergunningen 2016690, 2016793 en 2017836 behorende vergunninghouders en DEC hebben aangegeven dat (interne) nummers van projecten herleidbaar zijn tot individuele instellingen of bedrijven en daarmee vertrouwelijke bedrijfsinformatie zijn voor zowel de DEC als de betrokken vergunninghouder(s). De naam van de DEC betreft een bedrijfsgegeven en kan later – in combinatie – worden gekoppeld aan een groter aantal projecten en daarmee gedetailleerd inzicht geven in de bedrijfsvoering.

De context dan wel bijzonderheden van de gevraagde documenten in relatie tot de naam van de vergunninghouder of adviserende DEC kunnen reden zijn voor het weigeren van hun bedrijfsnamen (verwezen wordt naar de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 21 april 2016, AWB 15/6463). De context van de documenten geeft naar het oordeel van de CCD aanleiding voor het weigeren van de naam van voornoemde vergunninghouders en de DEC. Onder het kopje 'het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling' zal hierop nader worden ingegaan.

Eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer

Op grond van artikel 10 lid 2 aanhef en onder e van de Wob blijft verstrekking van informatie achterwege voor zover het belang daarvan niet opweegt tegen het belang dat de persoonlijke levenssfeer wordt geëerbiedigd.

Alle vergunninghouders en DEC's doen een beroep op bescherming van de persoonlijke levenssfeer met het oog op weigering van persoonsnamen en gegevens die direct herleidbaar zijn naar personen. Het betreft (in ieder geval) persoonsnamen, directe telefoonnummers, directe e-mailadressen, handtekeningen, literatuurverwijzingen naar 'eigen' onderzoek, eventuele afkortingen van namen en specifieke functies die (onder andere) staan vermeld in de aanvraagformulieren, verzonden en ontvangen brieven, verzonden en ontvangen e-mails, beschikkingen en vergunningen.

De CCD is van oordeel dat het belang van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer – waarmee deze gegevens worden beschermd – zwaarder dient te wegen dan het belang van openbaarheid van deze gegevens. Daarbij is van belang dat met het openbaar maken van persoonsnamen en tot personen herleidbare gegevens deze gegevens voor eenieder openbaar zijn en ook openbaar blijven. Dit is benadelend voor de betrokken personen. Zij kunnen hierdoor namelijk onheus worden bejegend door eenieder die het niet eens is met hun werkzaamheden. De CCD zal de namen van personen en alle daar direct of indirect naar herleidbare gegevens blijven weigeren.

In de memorie van toelichting bij de Wod (Tweede Kamer, vergaderjaar 2012–2013, 33 692, nr. 3) wordt benadrukt dat ook tot personen herleidbare gegevens onder de weigeringsgrond eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer kunnen vallen. Daarbij is in de Memorie van Toelichting aangehaald dat: "*het belang van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer zwaar moet wegen.*" Betrokkenen moeten vrijelijk en anoniem hun werk kunnen doen. Daarbij speelt een rol dat personen die betrokken zijn bij het verrichten van dierproeven een maatschappelijke taak uitoefenen en het risico lopen slachtoffer te worden van dierenrechtenactivisme. In het recente verleden zijn daar veel voorbeelden van



geweest. Uit vaste rechtspraak volgt dat dierenrechtenactivisme ook bij de Wob een terugkerend onderwerp is.

Binnen de context van de opgevraagde documenten bestaat de vrees voor gevaar voor de persoonlijke levenssfeer en dat derde belanghebbenden als gevolg van openbaarmaking overmatig en mogelijk zelfs ook gewelddadig worden benaderd door dierenrechtenactivisten. De incidenten die zich in het verleden hebben voorgedaan, bevestigen dat een kleine groep mensen een reëel risico kan vormen en dat de vrees voor acties van dierenrechtenactivisten gerechtvaardigd is. Verwezen wordt naar de uitspraak van rechtbank Midden-Nederland van 8 augustus 2016, zaaknummers UTR 15/3008 en UTR 15/3727. Dat er nog steeds een reële dreiging van radicaal dierenrechtenactivisme uitgaat, blijkt uit de recente uitspraken van de Raad van State van 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680), 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952) en 7 juni 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:1498).

De Raad van State stelt in deze laatste uitspraken dat het betrokken bestuursorgaan zich in redelijkheid op het standpunt heeft kunnen stellen dat het belang van betrokken derde belanghebbenden om tegen bedreigingen en intimidatie van dierenrechtenactivisten beschermd te blijven, en daarmee het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling als bedoeld in artikel 10 lid 2 sub g van de Wob, zwaarder dient te wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van de gevraagde gegevens. Uit de uitspraken volgt dat het belang van bescherming van werknemers van vergunninghouders, proefdierinstellingen en andere betrokkenen groot is en in de afweging van belangen zwaarder moet wegen dan het publieke belang van openbaarmaking van de gevraagde gegevens.

De CCD heeft de zienswijzen van derde belanghebbenden betrokken in haar conclusie en is – zoals hiervoor is toegelicht – van oordeel dat de bescherming van de persoonlijke levenssfeer zwaarder weegt dan het belang van openbaarmaking. De CCD merkt in dit kader wel op dat algemene functiebenamingen zoals 'Onderzoeker' of 'Hoogleraar' niet zijn weggelakt, omdat deze functiebenamingen dusdanig algemeen zijn dat deze niet leiden naar betrokken onderzoekers.

Uit de uitspraak van de Raad van State van 12 juni 2013 (ECLI:NL:RVS:CA2883) volgt dat ambtenaren met een publieke functie die in de openbaarheid treden en ambtenaren die besluiten krachtens mandaat hebben ondertekend in beginsel wel moeten aanvaarden dat hun namen met de ondertekening van de besluiten naar buiten komen (zie tevens de uitspraak van de Raad van State van 6 augustus 2014, ECLI:NL:RVS:3002). De naam van de secretaris van de CCD wordt dan ook openbaar gemaakt.

Het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling

Ingevolge artikel 10 lid 2 aanhef en onder g van de Wob blijft het verstrekken van informatie achterwege als het belang daarvan niet opweegt tegen het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling van bij de aangelegenheid betrokken natuurlijke personen of rechtspersonen dan wel van derden.

Herleidbaarheid

In een groot gedeelte van de documenten staat informatie die op zeer eenvoudige wijze te herleiden is naar de betrokken personen. Dit betekent een onevenredige benadeling van de betrokken personen die niet opweegt tegen het belang van openbaarmaking. Voor de toelichting verwijst de CCD tevens naar hetgeen is uiteengezet onder 'eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer'.

Alle betrokken vergunninghouders en DEC's verzoeken om persoonsnamen, persoonlijke contactgegevens en naar personen herleidbare gegevens niet openbaar te maken. Ze merken hierbij op dat ten aanzien van persoonsgegevens en andere tot personen herleidbare gegevens van degene die direct bij dierproeven zijn betrokken, het belang van de bescherming van de persoonlijke levenssfeer en het belang van het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling zwaarder dienen te wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking.

Naar aanleiding van hetgeen onder het kopje 'eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer' is aangegeven en vanwege hieronder te noemen redenen zullen de navolgende gegevens – waarmee deze organisaties of personen geïdentificeerd kunnen worden – uit de documenten worden verwijderd:

- Namen van natuurlijke personen, zoals onderzoekers en contactpersonen en specifieke functiebenamingen (zie hiervoor tevens het kopje 'eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer');
- Locatiegegevens van proefdierlocaties en sublocaties, kamernummers, postvaknummers, organisatieonderdelen en gebouwaanduidingen;
- Directe telefoonnummers en emailadressen, handtekeningen en eventueel faxnummers en rekeningnummers die direct herleidbaar zijn tot personen (zie hiervoor tevens het kopje 'eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer').

In verband met de rechtstreekse herleidbaarheid naar personen kan het eveneens voorkomen dat de naam wordt geweigerd van partners waarmee door de vergunninghouder wordt samengewerkt. In dit kader verwijst de CCD naar de uitspraak van de Raad van State van 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952).

In dit kader heeft de vergunninghouder bij vergunning 2017863 verzocht om in de bijlage beschrijving dierproeven éénmaal de naam van een samenwerkingspartner te weigeren. De CCD is van oordeel dat in verband met de directe herleidbaarheid naar personen in dit geval de naam van de samenwerkingspartner dient te worden geweigerd.

De vergunninghouder bij vergunning 2017854 heeft verzocht om het weigeren van een begrip dat op twee plaatsen in het projectvoorstel wordt genoemd. Dit begrip leidt – in combinatie met de gegevens die worden geopenbaard – tot de betrokken onderzoekers. De CCD kan de vergunninghouder volgen in haar oordeel dat het onevenredig benadelend voor de vergunninghouder is wanneer dit begrip in deze fase van het onderzoek reeds wordt geopenbaard, omdat het direct leidt naar de betrokken onderzoekers.



De hoofdlocaties van de instellingen worden, indien er geen bijzondere omstandigheden zijn aangevoerd, openbaar gemaakt, aangezien deze locaties over het algemeen reeds openbaar zijn. De openbaarmaking van proefdier- dan wel sublocaties die direct tot personen herleidbaar zijn en niet al eerder – bijvoorbeeld door publicatie op een website – zijn geopenbaard, wordt geweigerd. Op de proefdierlocatie worden de proefdieren gehouden en worden de dierproeven uitgevoerd. Deze informatie kan dierenrechtenextremisten aanleiding geven tot bedreiging en intimidaties. Hiervoor kan aansluiting worden bij de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 21 april 2016 (AWB 15/6463). Voor wat betreft de specifieke dierproeflocaties kan tevens aangesloten worden bij de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 22 juli 2014 (ECLI:NL:RBGEL:2014:4543) en de Memorie van Toelichting bij de Wod (*Kamerstukken II* 2012-2013, 33 692, nr. 3, p. 14).

In dit kader wordt eveneens verwezen naar de uitspraken van de Raad van State van 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680), 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952) en 7 juni 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:1498). De Raad van State stelt in genoemde uitspraken dat het betrokken bestuursorgaan zich in redelijkheid op het standpunt heeft kunnen stellen dat het belang van betrokken derde belanghebbenden om tegen bedreigingen en intimidatie van dierenrechtenactivisten beschermd te blijven en daarmee het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling als bedoeld in artikel 10 lid 2 aanhef en onder g van de Wob zwaarder dient te wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van de gevraagde gegevens. Uit de uitspraken volgt dat het belang van bescherming van werknemers van vergunninghouders, proefdierinstellingen en andere betrokkenen groot is en in de afweging van belangen zwaarder weegt dan het publieke belang van openbaarmaking van de gevraagde gegevens.

Indien er geen bijzondere omstandigheden zijn, worden de namen en locatiegegevens van de vergunninghouders en DEC's geopenbaard. Dit geldt eveneens voor overige gegevens die herleidbaar zijn naar de vergunninghouders en DEC's (zoals IBAN- en KvK-nummers en deelnemernummers).

Zoals reeds onder 'bedrijfs- en fabricagegegevens' aangegeven, kunnen de context dan wel de bijzonderheden van de gevraagde documenten in relatie tot de naam van de vergunninghouder of de adviserende DEC reden zijn voor het weigeren van hun bedrijfsnamen (uitspraak van de rechtbank Gelderland van 21 april 2016, AWB 15/6463). De context geeft naar het oordeel van de CCD aanleiding voor het weigeren van de naam van de vergunninghouders en DEC bij de vergunningen 2016690, 2016793 en 2017836.

De CCD is van oordeel dat onlangs inzichtelijk is gemaakt dat de betreffende instellingen recent het doelwit zijn geweest van dierenrechtenactivisten en dat er bij de betreffende instellingen een reëel risico bestaat dat de vergunninghouders het doelwit zijn van dierenrechtenactivisme. Er is sprake van actuele dreiging en intimidatie gericht op de betrokken derde belanghebbenden. De incidenten die zich hebben voorgedaan, bevestigen dat een kleine groep mensen een reëel risico kan vormen en dat de vrees voor acties van dierenrechtenactivisten gerechtvaardigd is. Vanwege het risico op dierenrechtenactivisme concludeert de CCD dat het belang van openbaarmaking van de naam van de betreffende

vergunninghouders en de hiernaar herleidbare gegevens in de opgevraagde documenten niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling door de openbaarmaking. Naast de hiervoor reeds genoemde uitspraken kan tevens worden verwezen naar de uitspraken van de rechtbank Midden-Nederland van 8 augustus 2016, zaaknummers UTR 15/3008 en UTR 15/3727 en de uitspraak van de rechtbank Oost-Brabant van 19 april 2017 (ECLI:NL:RBOBR:2017:2220).

Literatuurverwijzingen

De CCD is van oordeel dat referenties die naar onderzoekers leiden die ook betrokken zijn bij het huidige onderzoek geweigerd dienen te worden. Wanneer deze referenties worden geopenbaard, leidt dit immers direct tot de betrokken onderzoekers. De CCD is van oordeel dat het belang van openbaarmaking in dit geval niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling als gevolg van herleidbaarheid naar de personen van de onderzoeksgroep en het belang van bescherming van de persoonlijke levenssfeer van de betrokken personen. Hieronder zal worden aangegeven in welke vergunningen referenties naar eigen onderzoekers worden geweigerd.

De vergunninghouders bij vergunning 2016690, 2016793, 2017808, 2017817, 2017829, 2017854, 2017855, 2017865, 2017872 en 2017873 geven aan dat een gedeelte van de opgenomen referenties afkomstig is van of direct herleidbaar is naar de bij deze projecten betrokken onderzoekers. Zij verwijzen hierbij naar de nog altijd actuele dreiging van dierenrechtenactivisten. Zoals hiervoor reeds aangegeven, is de CCD van oordeel dat het belang van openbaarmaking in deze gevallen niet opweegt tegen de onevenredige benadeling als gevolg van de herleidbaarheid naar personen van de onderzoeksgroep en de bescherming van de persoonlijke levenssfeer van de betrokken personen.

Voor wat betreft vergunning 2016779 is onder 'bedrijfs- en fabricagegegevens' reeds aangegeven dat de vergunninghouder dermate vrijblijvende bewoordingen en omschrijvingen heeft gebruikt in haar zienswijze, dat het voor de CCD niet te beoordelen is of de gebruikte referenties in het onderhavige project afkomstig of direct herleidbaar zijn naar de bij dit project betrokken onderzoekers.

Handtekeningen

Wanneer de CCD handtekeningen van bestuurders openbaar maakt, zijn deze eenvoudig te kopiëren. Het is niet uitgesloten dat kwaadwillende personen deze handtekeningen gebruiken voor frauduleuze doeleinden. Het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling weegt de CCD hier zwaarder dan het belang van openbaarmaking. Derhalve zijn in alle besluiten en overige brieven de handtekeningen geanonimiseerd.

Concurrentiegevoelige informatie

Indien openbaarmaking van concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie leidt tot onevenredige benadeling, kan onder omstandigheden succesvol een beroep op de weigeringsgrond 'het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling' worden gedaan.

Een groot gedeelte van de betrokken vergunninghouders en DEC's heeft middels zienswijzen aangegeven dat verschillende documenten concurrentiegevoelige



informatie bevatten die in verband met het voorkomen van onevenredige benadeling niet geopenbaard dient te worden. De vergunninghouders bij de vergunningen 2016690, 2016714, 2016793, 2017808, 2017829, 2017851, 2017854, 2017855, 2017863, 2017865, 2017872, 2017873 en 2017879 hebben hierbij aangegeven dat onder andere de onderzoeksstrategie niet mag worden geopenbaard.

Zoals onder 'bedrijfs- en fabricagegegevens' is aangegeven, is de CCD voor wat betreft vergunning 2016690 van oordeel dat het soort te onderzoeken cellen – zoals genoemd op twee plaatsen in het projectvoorstel – is aan te merken als concurrentiegevoelige informatie. De CCD meent dat deze informatie aangeeft naar welke targets en op welk niveau onderzoek wordt gedaan, wat in dit stadium van het onderzoek nog niet dient te worden geopenbaard. Deze informatie zal derhalve worden geweigerd.

Voor vergunning 2016714 heeft de vergunninghouder aangegeven dat de gebruikte benadering/aanpak niet mag worden geopenbaard, omdat de onderzoekers bij openbaarmaking het risico lopen op onevenredige benadeling. Er is sprake van een unieke aanpak en de betrokken onderzoekers willen de onderzoeksresultaten als eerste kunnen publiceren. De CCD kan de vergunninghouder volgen in haar redenering en komt tot de conclusie dat enkele begrippen/zinsdelen telkens worden herhaald en op (nagenoeg) dezelfde plaats in de tekst zijn opgenomen. Slechts enkele woorden/zinsdelen worden derhalve geweigerd.

Onder 'bedrijfs- en fabricagegegevens' en 'literatuurverwijzingen' is reeds aangegeven dat de vergunninghouder bij vergunning 2016779 dermate vrijblijvende bewoordingen en omschrijvingen heeft gebruikt in haar zienswijze, dat het voor de CCD niet is te beoordelen of de beschreven situaties – ook in het geval van concurrentiegevoelige informatie – zich ook in deze vergunning voordoen.

Aangaande vergunning 2017808 en 2017829 heeft de vergunninghouder aangegeven dat gedetailleerde informatie met betrekking tot medicijnen en technieken die worden onderzocht niet mag worden geopenbaard. De betreffende informatie is onderdeel van patentaanvragen die in voorbereiding zijn. Totdat de patentaanvraag is goedgekeurd, dient de informatie volledig vertrouwelijk te blijven. De vergunninghouder heeft voorts aangegeven dat er sprake is van twee technieken waartussen tot op heden nog geen vergelijking is gemaakt.

De CCD is van oordeel dat de patentaanvragen niet in het geding mogen komen door vroegtijdige openbaarmaking van de betreffende informatie. De CCD is voorts met vergunninghouder van oordeel dat de afkeuring van patentaanvragen – naar aanleiding van het vroegtijdig openbaar worden van de informatie – ook verstreckende financiële consequenties voor de vergunninghouder met zich meebrengt, welke onevenredig benadelend zijn. De CCD is tenslotte van oordeel dat de namen van de gebruikte technieken en hiernaar herleidbare gegevens dienen te worden geweigerd. De CCD kan de vergunninghouder volgen in haar motivering dat deze unieke vergelijking niet vroegtijdig geopenbaard dient te worden, vanwege onevenredige benadeling van de betrokkene.

Zoals onder 'bedrijfs- en fabricagegegevens' reeds is aangegeven, wordt in vergunning 2017817 informatie geweigerd, vanwege de aldaar genoemde redenen. De vergunninghouder heeft bovendien aangegeven dat voor dit onderzoek wordt samengewerkt met een particuliere organisatie en dat bij voortijdige openbaarmaking van de betreffende informatie contractbeëindiging plaatsvindt. De CCD concludeert hieruit dat sprake is van zeer concurrentiegevoelige informatie. Vroegtijdige openbaarmaking en contractbeëindiging zullen leiden tot financiële schade en imagoschade. De betreffende informatie zal derhalve eveneens op grond van het voorkomen van onevenredige benadeling van de onderzoekers worden geweigerd.

Bij vergunning 2017836 heeft de vergunninghouder verzocht om weigering van de productnaam (de werkzame stof), de doseringen van het product waarmee in de doeldieren wordt getest, de challengedoses, andere vormen van registratie van dit product en het unieke challengemodel dat wordt gebruikt om het product te registreren. Voortijdige openbaarmaking van voornoemde gegevens kan voor opdrachtgevers aanleiding zijn om de vergunninghouder geen onderzoeken meer te laten uitvoeren. De CCD is van oordeel dat de genoemde informatie in combinatie met alle overige te openbaren informatie als concurrentiegevoelig is aan te merken. Om die redenen wordt voornoemde informatie niet geopenbaard.

Voor wat betreft vergunning 2017865 is door de vergunninghouder aangegeven dat het te gebruiken type dier dient te worden geweigerd, omdat de betrokken onderzoeksgroep de enige onderzoeksgroep is die het betreffende type dier voor dit type onderzoek gebruikt. De CCD heeft geconstateerd dat wanneer dit type dier in combinatie met de naam van de vergunninghouder bij Google search wordt ingevoerd, dit direct herleidbaar is naar de betrokken afdeling en leden van de onderzoeksgroep. De CCD acht dit onevenredig benadelend voor de betrokkenen.

Voorts is met betrekking tot deze vergunning aangegeven dat specifiek benoemde detailsaspecten van de projectaanvraag, de onderzoeksrichting, de uitvoeringsmethoden en gemaakte (materiaal)keuzes geweigerd dienen te worden, omdat het concurrentiegevoelige informatie betreft. Bij openbaarmaking in dit stadium van het onderzoek leidt dit tot onevenredige benadeling.

De vergunninghouder bij vergunning 2017872 heeft verzocht om weigering van onderzoeksgegevens die nog niet zijn gepubliceerd. Het voortijdig openbaar maken van data kan lopend onderzoek frustreren. De vergunninghouder heeft voorts aangegeven dat het van het type dier dat is gebruikt niet bekend is bij welke andere organisaties dit type eveneens gebruikt is. De vergunninghouder is van oordeel dat openbaarmaking in dit stadium van de data in combinatie met het type dier onevenredig benadelend werkt, omdat andere instellingen in dat geval het onderzoek kunnen reproduceren.

De CCD is van oordeel dat uit de te weigeren informatie in de vergunningen 2017865 en 2017872 kan worden opgemaakt uit welke stappen het onderzoek bestaat en hoe de vergunninghouder tot de keuze van die stappen is gekomen. Dit geeft inzicht in de afwegingen van vergunninghouder op belangrijke beslispunten – waaronder de keuze voor het type dier en het materiaal – en in de wijze van totstandkoming van het productieproces. Bovendien betreft het nog niet gepubliceerde hypothesen, welke nader uitgewerkt dienen te worden. Deze



informatie is in hoge mate concurrentiegevoelig, omdat concurrenten de informatie kunnen gebruiken voor een eigen onderzoeksstrategie in een vergelijkbare of identieke situatie. Daarnaast hebben de onderzoekers een financieel belang bij de eerste publicatie van de onderzoeksresultaten.

Persoonlijke beleidsopvattingen in een stuk bestemd voor intern beraad

Artikel 11 lid 1 van de Wob bepaalt dat in geval van een verzoek om informatie uit documenten, opgesteld ten behoeve van intern beraad, geen informatie wordt verstrekt over daarin opgenomen persoonlijke beleidsopvattingen.

Voor wat betreft documenten ten behoeve van intern beraad is het oogmerk waarmee het document is opgesteld daartoe bepalend. Uit de uitspraak van de Raad van State van 21 december 2016 (ECLI:NL:RVS:2016:3376) blijkt uit rechtsoverweging 2.2: *"Zoals eveneens volgt uit de geschiedenis van de totstandkoming van de Wob (Kamerstukken II 1986/87, 19 859, nr. 3, blz. 14 en 38) en zoals de Afdeling evenzeer eerder heeft overwogen (onder meer in de uitspraak van 18 augustus 2010, ECLI:NL:RVS:2010:BN4268), beoogt artikel 11, eerste lid, van de Wob ter bescherming van de vrije meningsvorming te verzekeren dat de bij ontwikkeling van beleid van een bestuursorgaan betrokken personen in alle vrijheid en in een vertrouwelijke sfeer in gedachten en opvattingen kunnen uiten zonder vrees voor gezichtsverlies."*

Aangaande het advies van het secretariaat van de CCD aan het bestuur van de CCD kan worden aangegeven dat dit is opgesteld ten behoeve van overleg en meningsvorming over een bestuurlijke aangelegenheid, zodat het is opgesteld ten behoeve van intern beraad. Bovendien bevat het advies meningen, voorstellen en inschattingen van de opsteller met betrekking tot een bestuurlijke aangelegenheid. Derhalve bevat het advies persoonlijke beleidsopvattingen. De feiten die in het document zijn opgenomen, zijn zozeer met de persoonlijke beleidsopvattingen verweven, dat het niet mogelijk is om deze daarin te scheiden. Hiervoor kan eveneens aansluiting worden gezocht bij genoemde uitspraak van de Raad van State van 21 december 2016 en de uitspraak van de Raad van State van 24 juni 2015 (ECLI:NL:RVS:2015:1942).

Tenslotte volgt uit deze uitspraak dat artikel 11 lid 1 van de Wob bestuursorganen gebiedt om geen informatie over persoonlijke beleidsopvattingen openbaar te maken uit documenten die ten behoeve van intern beraad zijn opgesteld en dit artikel laat geen ruimte voor een belangenafweging.

Uit de uitspraak van de Raad van State van 28 december 2016 (ECLI:NL:RVS:2016:3478) volgt voorts dat het bestuursorgaan dat verantwoordelijk is voor de betrokken bestuursvoering bevoegd is om, los van de bereidheid van betrokkenen om in te stemmen met openbaarmaking, de informatie niet te verschaffen (*Kamerstukken II 1986/87, 19 859, nr. 3, blz. 38*). Zoals de Afdeling eerder heeft overwogen (in de uitspraak van 3 juni 2009, ECLI:NL:RVS:2009:BI6049) kan de kring van betrokkenen een rol spelen bij de beantwoording van de vraag of een geanonimiseerde versie van de persoonlijke beleidsopvattingen kan worden verstrekt.

In het onderhavige geval betreft het een beperkte en aanwijsbare groep ambtenaren. De CCD acht het niet van belang voor een goede en democratische

bestuursvoering indien standpunten en adviezen van ambtenaren zelfstandig worden betrokken in de publieke discussie. DE CCD ziet dan ook geen aanleiding om met toepassing van artikel 11 lid 2 van de Wob in niet tot personen herleidbare vorm informatie te verstrekken over deze persoonlijke beleidsopvattingen.

Uitzonderingen op het bovenstaande vormen de data van de vergaderingen van de CCD die in de ambtelijke adviezen zijn opgenomen. Deze data staan in de verslagen van de vergaderingen van de CCD vermeld, welke op de website van de CCD staan gepubliceerd. Door de zoekterm 'verslag' in te voeren, zijn deze verslagen eenvoudig te achterhalen. Op deze wijze is deze informatie reeds openbaar.

In de inventarislijsten behorende bij de projectvergunningen is aangegeven welke documenten geheel of gedeeltelijk worden geweigerd op grond van bovenstaande wettelijke weigeringsgrond.

Wijze van openbaarmaking

De verwachting bestaat dat (derden)belanghebbenden bezwaar hebben tegen de openbaarmaking van de informatie. Derhalve vindt de feitelijke openbaarmaking van de documenten – conform artikel 6 lid 5 van de Wob – **niet eerder plaats dan vier weken na dagtekening van dit besluit**. Op deze wijze wordt aan deze belanghebbenden de mogelijkheid geboden om te proberen de openbaarmaking van de documenten tegen te houden.

Dit kan door het indienen van een bezwaarschrift bij de CCD én door daarnaast bij de rechtbank te verzoeken om – bij wijze van voorlopige voorziening – het onderhavige besluit tot openbaarmaking te schorsen. De documenten die met dit besluit voor eenieder openbaar worden, zullen na afloop van bovengenoemde termijn op de website van de CCD (www.centralecommissiedierproeven.nl) worden geplaatst.

Indien binnen vier weken na dagtekening van dit besluit een verzoek om voorlopige voorziening is ontvangen en een (pro forma) bezwaarschrift is ingediend, wordt de uitspraak van de voorzieningenrechter afgewacht, voordat tot daadwerkelijke openbaarmaking wordt overgegaan.

Hopende u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd.

Hoogachtend,

De Centrale Commissie Dierproeven,
namens deze

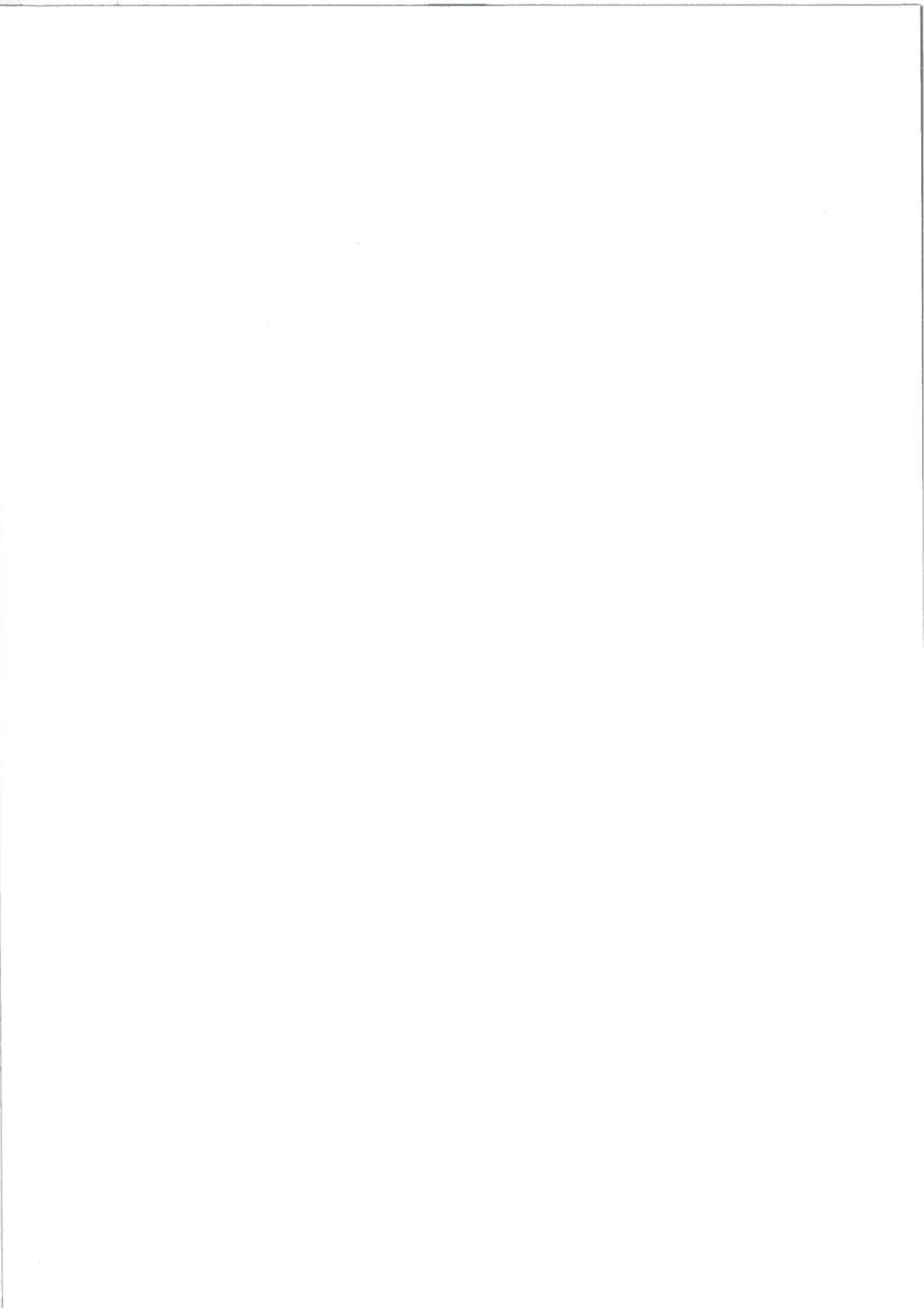


ir. J.F.M. Daemen
wnd. Algemeen Secretaris



Bezwaar

Indien u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Het bezwaarschrift kunt u sturen naar de Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag. Bij het indienen van een bezwaarschrift vragen wij u in ieder geval – buiten de in de wet geregelde voorschriften – de datum van de beslissing waartegen u bezwaar maakt en het onderwerp te vermelden. U vindt deze gegevens bovenaan deze brief. Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat het bestreden besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de voorzieningenrechter van de rechtbank. 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 www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx kunt u zien onder welke rechtbank uw vestigingsplaats valt.



Inventaris Wob-verzoek W17-08										
nr.	document NTS 2016714	wordt verstrekt				weigeringsgronden				
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	Origineel NTS			x						
3	Origineel projectvoorstel				x	x		x		
4	Originele bijlage				x	x		x		
5	Ontvangstbevestiging en factuur				x		x	x		
6	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
7	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
8	Projectvoorstel versie 2				x	x		x		
9	Bijlage 1 versie 2			x						
10	Bijlage 2 versie 2				x	x		x		
11	Bijlage 3 versie 2				x	x		x		
12	Bijlage 4 versie 2				x	x		x		
13	DEC advies				x		x	x		
14	NTS versie 2			x						
15	Projectvoorstel definitief				x	x		x		
16	Bijlage 1 definitief			x						
17	Bijlage 2 definitief				x	x		x		
18	Bijlage 3 definitief				x	x		x		
19	Bijlage 4 definitief				x	x		x		
20	NTS definitief	x								
21	Advies CCD		x							x
22	Reactie op voornemen afwijzing CCD				x		x	x		
23	Aanvullend advies DEC				x		x	x		
24	Beschikking en vergunning				x		x	x		



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?
Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.
- Ja > Vul uw deelnemernummer in 11500
 Nee > U kunt geen aanvraag doen
- 1.2 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.
Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.
- 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] Dhr. Mw.
Functie Assistent Professor
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] Dhr. Mw.
Functie OIO
Afdeling [Redacted]
Telefoonnummer [Redacted]
E-mailadres [Redacted]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 11 - 2016
- Einddatum 31 - 10 - 2021
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Neutrophil subsets in health and disease
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Neutrofielen subtypes in gezondheid en ziekte
- 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 € 935,- 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

Utrecht
 11-10-2016



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 | Neutrofielen subtypes in gezondheid en ziekte
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Neutrofiel, inflammatie, kanker, microplastics

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)
- Het afweersysteem is van levensbelang om ziekteverwekkers, kanker en ander niet-lichaamseigen materiaal te bedwingen. Bij een infectie moeten afweercellen (witte bloedcellen) opgeroepen en aangezet worden om ziekteverwekkers te bestrijden en zo het lichaam te beschermen. Neutrofielen zijn de meest voorkomende afweercellen in het bloed en zijn als eerste ter plekke bij de infectie of ontsteking. Maar soms schieten de neutrofielen door. Ze reageren dan te hevig op de infectie, met als gevolg dat de neutrofielen gezond weefsel beschadigen. Zo kunnen de neutrofielen zelfs meer schade aanrichten dan de ziekteverwekker zelf. Het is dus van groot belang dat neutrofielen uitgezet worden wanneer ze niet meer nodig zijn. Recentelijk zijn er twee extra subtypen neutrofielen gevonden. Eentje die beter bacteriën kunnen doden dan de 'gewone' in het bloed en een andere die de afweer juist kunnen onderdrukken. Als we begrijpen wanneer deze

neutrofielen opgeroepen worden, waar ze vandaan komen en hoe lang ze leven kunnen we dit in de toekomst gebruiken voor therapie. Dan kunnen we bijvoorbeeld de onderdrukkers sturen als de schade uit de hand dreigt te lopen of de goede bacteriedoders inzetten als er een systemische infectie (sepsis) is.

Ook willen we de rol van neutrofielen (subtypen) bij uitzaaiingen van kanker bestuderen. Er is namelijk een positief verband tussen het aantal neutrofielen en tumorprogressie.

Een andere deelvraag is hoe neutrofielen reageren op microplastics. Dit zijn microscopisch kleine stukjes plastic (kleiner dan 1 micrometer) die tegenwoordig veelvuldig in het milieu en onze voedselketen terechtkomen. Er wordt nog erg weinig onderzoek gedaan naar de invloed van microplastics op de gezondheid en neutrofielen zijn waarschijnlijk de afweercellen die deze plastics als eerste tegenkomen in ons lichaam.

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

Met dit project willen wij het grondwerk leggen voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën om doorgeslagen afweerreacties te dempen of juist een zwak afweersysteem te helpen bacteriën te overwinnen. Tevens willen we bestuderen of en hoe neutrofielen tumorprogressie bewerkstelligen. Tenslotte willen we vaststellen of microplastics, die steeds meer in het milieu en onze voedselketen terechtkomen, een negatief effect hebben op de functie van de neutrofiel.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

In dit project zullen muizen als proefdier gebruikt worden. Aantallen: max. 3000 **muizen gedurende** 5 jaar

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

Kortdurend licht tot matig ongerief als gevolg van het toedienen van stoffen, bijvoorbeeld via injecties (niet door de gevolgen hiervan) en in een aantal gevallen matig ongerief door operaties. Gegeven het doel van het onderzoek krijgen de muizen tumoren, infecties, ontstekingen of microplastics toegediend om de neutrofielen in deze situaties te kunnen bestuderen.

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

Een groot deel ($\pm 90\%$) van de proefdieren zal matig ongerief te verdragen krijgen en de rest licht ongerief

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Na afloop van de experimenten worden de muizen gedood om de organen en cellen van de muizen tot in detail 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.

Voordat we besluiten over te gaan tot proefdierstudies, doen we eerst experimenten met humane cellen uit het bloed van zowel gezonde als zieke individuen. De resultaten uit deze experimenten bepalen uiteindelijk het besluit om een dierexperiment te gaan doen. Gegevens uit klinische studies bij patiënten kunnen ook aanleiding zijn voor het uitvoeren van dierproeven. De afweerbalans in het lichaam is uitermate complex. Het samenspel tussen meerdere organen speelt hierbij een cruciale rol die we in de mens onvoldoende kunnen bestuderen omdat we de complexiteit van een menselijk lichaam nog niet in een reageerbuisje kunnen nabootsen. Ook

kunnen we bij mensen niet zomaar van alle weefsels monsters nemen.

4.2 **Vermindering**

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

Door een goede statistische onderbouwing gekoppeld aan jarenlange ervaring kunnen we wetenschappelijk verantwoorde studies uitvoeren met een minimum aantal muizen. Afhankelijk van de uitkomsten van de eerste experimenten wordt telkens tussentijds kritisch bekeken of de hypothesen aangepast moeten worden en de uitvoering van de experimenten nog steeds essentieel is. Uiteraard worden alleen door de Instantie voor Dierenwelzijn goedgekeurde experimenten uitgevoerd.

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.

In dit project maken we gebruik van muizen. We weten dat het afweersysteem van de muis lijkt op dat van de mens en dat menselijke ziektes nagebootst kunnen worden in de muis. Er is al veel informatie beschikbaar over het afweersysteem van de muis, wat ons zal helpen in ons onderzoek. Veel van de voor ons onderzoek benodigde hulpmiddelen zijn alleen beschikbaar voor muizen.

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

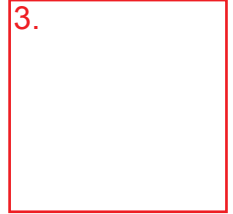
Gedurende het verloop van de ziektes zullen we de dieren frequent beoordelen op welbevinden en gewicht. Bij onverwacht of overmatig ongerief zullen de muizen worden gedood.

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.

The neutrophilic granulocyte is the first line of defense against invaders such as bacteria, fungi, foreign particles and aberrant cells. As the most abundant white blood cell, it continuously circulates the blood until a signal causes it to extravasate towards the tissue. In the tissue upon phagocytosis the neutrophil will exploit the content of its granules to degrade the foreign invader or cell debris. Besides pathogens

and cell debris, we will also further zoom in on one type of foreign particles that neutrophils can encounter in the human body, microplastics. These $\leq 1\mu\text{m}$ plastic particles are very prevalent in our environment (eg in our drinking water and aquatic animals via erosion from plastic litter), but research into health effects in mammals is virtually non-existent.

Neutrophils have always been described as a homogeneous population of short-lived cells. However, recent publications of our research group and others challenge this view. Our group described that neutrophils have a longer lifespan than previously thought. And whereas the population in blood in homeostasis might be homogeneous, various stimuli disturbing homeostasis lead to heterogeneity in phenotype and function. Our group showed that if healthy humans receive an LPS injection, immature, banded neutrophils appear in the blood, which are much better at killing bacteria than mature neutrophils (Leliefeld *et al.*, manuscript in preparation).

Recently, neutrophils have been described to play a role in the pathogenesis of various human diseases such as cardiovascular disease, cancer, auto-immune diseases and allergy¹⁻⁴. Linked to these conditions, several neutrophil subsets have been newly described such as low-density granulocytes, granulocytic myeloid-derived suppressor cells (G-MDSC), tumor-associated neutrophils (TAN), and hypersegmented neutrophils⁵. Although we know that homeostatic neutrophils in humans and mice behave very similar, the similarity of neutrophil subsets in humans and mice is poorly described.

In disease, neutrophils can play a beneficial but also often a detrimental role. For example, neutrophils have been described to both promote and inhibit tumor progression and metastasis⁶. They can be both pro- and anti-inflammatory⁵. At the wrong time or the wrong place, neutrophil activation and degranulation will result in overwhelming inflammation and major tissue damage. Neutrophils present in a tumor are correlated with a worse prognosis, but the mechanisms behind this correlation are unclear⁶. The ability to steer neutrophil function, activation or localization from the outside would be beneficial for many diseases. The treatment of cancer would likely benefit from targeting only the pro-tumor neutrophil subset as opposed to all neutrophils. In contrast, the treatment of asthma would greatly benefit from targeting only the pro-inflammatory neutrophil subset.

But the basic knowledge on the timing, localization or even origin of neutrophil subsets is lacking, because we cannot easily sample human tissues. We know neutrophils develop in the bone marrow, but the time they need to develop is uncertain. We know neutrophils are able to migrate to lymph nodes via lymph vessels, but the signal driving them as well as their function in the lymph node are unclear. We know different subtypes of neutrophils have different functions, but when and where the differentiation of these subsets starts to diverge is again unclear.

To answer these types of questions, we need to gain a better understanding of the complex interplay of the entities that can guide the neutrophil: most importantly the bone marrow, spleen, endothelium, inflamed tissue, tumor cells, foreign particles, other immune cells and the neutrophil itself. As well, we think it is important to understand whether neutrophil subsets observed upon inflammation are the same throughout the range of inflammatory disorders. If they have a different phenotype and/or function for different types of disorders, that would be highly relevant for designing new therapies.

Understanding how and where the different neutrophil subsets arise in inflammatory conditions and what mechanisms underlie their function is essential to determine their role in disease and to establish potential treatment options. Redirection of immune responses has an enormous societal and scientific relevance as inflammation-associated diseases (including cardiovascular disease, cancer, auto-immunity and allergy) are associated with major pathology and morbidity.

In this research project we will combine data of healthy mice, mice with acute inflammation and mice with chronic inflammation, to help us understand why and when different neutrophil subsets are developed and recruited. Even if murine neutrophil subsets do not resemble those in human, this data will together show whether the response of the neutrophil to inflammation is generic, or tailored to the stimulus. Examples of inflammatory stimuli are pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), damage-associated molecular patterns (DAMPs) and tumor antigens. At the same time, we will have a better idea whether inhibiting or stimulating neutrophils in these specific conditions would be beneficial or detrimental to the disease progression.

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 gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and

function of neutrophils in inflammatory conditions. These research questions will therefore be addressed:

- Is the neutrophil population heterogeneous in morphology?
- Is the neutrophil population heterogeneous in function?
- Does the migration & distribution of neutrophils throughout the body depend on the type of inflammatory stimulus?
- Does the differentiation of neutrophils depend on the type of inflammatory stimulus or organ?
- Does the function of neutrophils depend on the type of inflammatory stimulus?
- Does the life-span of neutrophils depend on the type of inflammatory stimulus?
- Does the interaction of neutrophils differ per type of inflammatory stimulus?
- Does the phagocytosis of microplastics influence neutrophil function?

From human data, we know that heterogeneous neutrophil subsets appear in the blood upon strong immune stimulation such as LPS injection, cancer, trauma or viral infection. However, these different conditions result in a different timing of the presence of subsets. Our preliminary data shows neutrophil heterogeneity is also induced in mice upon trauma (acute inflammation) or solid tumor growth (chronic inflammation).

In healthy mice, mice with acute inflammation and mice with chronic inflammation, we will analyze the phenotype and function of the neutrophils *ex vivo*, crucially supported by analysis of the kinetics of murine neutrophils *in vivo*. *Ex vivo* analysis is aided by our longstanding experience with flow cytometry and assays on neutrophil function (migration, phagocytosis, ROS formation, degranulation, etc., etc.). In the kinetics studies we will study the distribution of neutrophils by *ex vivo* analysis of the neutrophils in different organs, as well as the migration of neutrophils by intravital imaging. In these intravital imaging experiments, neutrophil migration is easily tracked in mice that produce fluorescent neutrophils such as the LysM-GFP or the Catchup^{IVM} mouse^{7, 8}.

There are several other reasons why we are confident that we can achieve our aims: Our group is embedded in the Laboratory of Translational Immunology (LTI), which is a center-of-excellence on fundamental and translational immunological research. Since the clinic is very close and our medical PhD students closely collaborate with clinical doctors, we can obtain patient material for research. The complementary use of patient material and well-defined animal models will ensure the successful completion of this project. The LTI provides core facilities for various high-end techniques such as histology, fluorescent confocal imaging, intravital imaging and flow cytometry. Moreover, the animal facility offers dedicated staff providing the regular housing of the animals and support and counsels the scientist in their experiments. Within our group, only trained and experienced people perform experiments.

Our research and experiments are constantly evaluated within our group, and by various other groups within our institute and campus. To aid our research on microplastics, we collaborate with experts from different fields in the TA-COAST consortium. Over the last few years, we have built up a repertoire of state-of-the-art *in vivo* imaging techniques to study immune cells in living mice. This has led to many new discoveries and breakthroughs published in scientific journals⁹⁻¹⁵. Our research is funded by major funding agencies. Our embedding in an excellent scientific environment, our unique techniques and approaches, and our previous achievements make it very likely that with the experiments described in this project we will make large contributions to our main research questions.

3.3 Relevance

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

The enormous burden of inflammation-associated diseases (including cardiovascular disease, cancer, auto-immunity and allergy) worldwide is aggravated by lack of adequate treatment options. This is due to insufficient knowledge about the common player in virtually all inflammatory processes: the neutrophil. The burden of neutrophil-mediated pathology is high, but no specific therapy is currently available. The estimated costs to society (EU) are now above 250 billion euros annually, which will only rise in the future¹⁶. Recent insights show that the neutrophil can be both pro- and anti-inflammatory⁵. Inhibition of pro-inflammatory neutrophils and activation of anti-inflammatory neutrophils will be beneficial for patients in pro-inflammatory states, whereas patients with a suppressed immune system such as in cancer or after acute severe inflammation may profit from a reverse approach. The lack of knowledge regarding this emerging concept has to date precluded the development and translation of the manipulation of neutrophils into a clinical application. Successful manipulation of the different neutrophil subsets will be widely applicable to a range of different inflammatory diseases.

Pollution of the water environment with microplastics by erosion of plastic litter is a pressing problem that has received a lot of attention in the last few years. It has been shown that microplastics end up in

our food chain, but their effects on human health are currently understudied. To assess their effects on human health we look at neutrophils, since they are specialized in taking up foreign particles. Our preliminary human *in vitro* data shows that neutrophils are also able to engulf microplastics. These microplastics are likely not degraded by the neutrophils and might have an effect on their survival and their capacity to subsequently kill pathogens. If we demonstrate that microplastics adversely affect human health, evidence-based regulatory measures can be formulated.

3.4 Research strategy

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

The strategy of this project is to combine human *in vitro* experiments with murine *ex vivo* and *in vivo* experiments. The readout of each animal experiment will consist of some or all of the following:

- descriptive data on single cell level (flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.)
- functional data (on specific functions of the neutrophil such as migration, phagocytosis, etc)
- intravital microscopy data
- descriptive data on disease progression (e.g. weight loss, microbial load, tumor size).

The methods for obtaining these readout parameters will be the same for all experiments in this proposal, but the inflammatory stimulus will differ per experiment. We think the combination of several inflammatory stimuli is the strength of this project, because currently it is unknown whether neutrophils respond the same to diverse inflammatory signals (e.g. PAMPs, DAMPs, tumor antigens).

Supported by our own research on human material, pigs and mice, we have a number of hypotheses that we will start with. However, since our research is mostly fundamental and novel, we cannot know whether these hypotheses will prove correct. In the next five years, human data will be combined with data from the animal experiments to adapt our hypotheses when necessary.

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.

Firstly, we want to investigate whether the morphology and function of murine neutrophil subsets is similar to the subsets we described in humans (¹⁷, Tak *et al.* submitted, Leliefeld *et al.* manuscript in preparation). Therefore we will start with an experiment of LPS injection in mice similar to our experiments with LPS injection in humans. But to extend our findings to more physiological inflammatory stimuli, we want to use bacterial infection, viral infection, plastic particles or sterile injury. To look at stimuli specific for chronic inflammation, we want to use animals with solid tumor growth or airway allergy, two relevant diseases with a significant but opposite role for neutrophils. Homeostatic neutrophils will be analyzed *ex vivo* and *in vivo* and compared to the neutrophils arising in an inflammatory state. As described in 3.1, neutrophil behavior is determined by a complex interplay of the bone marrow, spleen, endothelium, inflamed tissue, tumor cells, foreign particles, other immune cells and the neutrophil itself. To study this system, we want to modify these entities one by one. Therefore we will perform one or more of the following interventions in these mice:

- Administration of drugs/antibodies/inhibitors
We might be able to rescue or mimic the phenotypes of the neutrophil subsets and therefore further identify the function of these cells *in vivo*. If possible and/or relevant, we will always test these compounds first *in vitro* and in case relevant effects are observed shift to in the *in vivo* experiments.
- *In vivo* labeling
In vivo antibody administration, injection of fluorescent compounds for short term labeling of blood vessels, transfer of labelled erythrocytes to long-term label blood vessels, injection of propidium iodide to monitor cell death, injection of Hoechst to stain nuclei, administration of compounds which incorporate into DNA to measure cell life span and proliferation such as deuterated water, deuterated glucose, EdU or BrdU.
- Adoptive transfer
To study human cells *in vivo* or to, for instance, compare wildtype neutrophils with neutrophils that have a mutation we need to adoptively transfer donor neutrophils into recipient mice. Irradiation of recipient mice to deplete their endogenous immune system might be required. Also (fluorescently) labeled cells might be transferred for tracking purposes.
- Bone marrow scaffold
To study neutrophil progenitors and differentiation. Intravital imaging of the bone marrow compartment is hard due to the solid thick nature of the surrounding bone. In a pilot study we have successfully placed an imaging window on a subcutaneous bone marrow scaffold [Groen Blood 2012] allowing the visualization of cells in the bone marrow.

- Splenectomy
To study [REDACTED] and [REDACTED]. Literature as well as our preliminary data suggests that some [REDACTED] may specifically [REDACTED]. Additionally, [REDACTED] with other [REDACTED], may [REDACTED]. To study how these subtypes or cell-cell interactions affect the immune system as a whole, we are interested in applying our inflammatory stimuli in splenectomized animals.
- Neutrophil depletion
Administration of anti-Ly6G-antibody or use of Ly6G-Cre conditional knockout to investigate the role of neutrophils.

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.

For most experiments we first consider *ex vivo* experiments (mild discomfort), before we consider intravital imaging experiments (mild to moderate discomfort). In some experiments we first consider intravital imaging, either because some questions can only be answered by imaging the same tissue over multiple imaging sessions, or because it significantly reduces the number of required mice (can be up to a reduction of 20x); multiple time points can be measured in one individual, and there is no inter-mice variation. After completion of the intravital imaging experiments, cells, tissues and organs will be isolated and analyzed to reduce the number of mice required. For using the different inflammatory stimuli mentioned under 3.4.2, the experiments for optimization and set-up will be the same.

Milestones:

- Phenotypic definition of neutrophil subsets (surface marker expression, nuclear morphology, etc.)
 - Functional definition of neutrophil subsets (better/worse in killing, pro- or anti-inflammatory, etc.)
- *Go/no-go moment: When we do not find distinct subsets in the mouse but a homogenous neutrophil population, this milestone will not be pursued:
- To know where [REDACTED]
- But these milestones below are independent of the go/no-go moment:
- To know whether phenotype and function of neutrophils is the same throughout a range of inflammatory disorders
 - To know whether the interaction between the neutrophils and the inflammatory stimulus is the same throughout a range of inflammatory disorders
 - To know the distribution pattern of neutrophils/neutrophil subsets after leaving the bone marrow, in homeostasis vs. inflammatory conditions
 - To know the life-span of murine neutrophils/neutrophil subsets, in homeostasis vs. inflammatory conditions
 - To confirm whether neutrophils/neutrophil subsets continue migrating towards other organs after phagocytosis of pathogens in infected tissue
 - To confirm whether [REDACTED]
 - To know whether inhibition of neutrophils/neutrophil subsets can relieve symptoms in allergic airway disease
 - To know whether inhibition of neutrophils/neutrophil subsets has an effect on tumor growth

These milestones can be reached simultaneously and do not depend on each other. When we do not reach the first three milestones, i.e. when we do not find distinct subsets in the mouse but a homogenous neutrophil population, then the latter milestones remain valuable for this homogenous neutrophil population.

References

1. Maskrey, B. H., Megson, I. L., Whitfield, P. D. & Rossi, A. G. *Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1001-1006 (2011).
2. Moses, K. & Brandau, S. *Human neutrophils: Their role in cancer and relation to myeloid-derived suppressor cells*. *Semin. Immunol.* **28**, 187-196 (2016).
3. Kaplan, M. J. *Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases*. *Arthritis Res. Ther.* **15**, 219 (2013).
4. Bruijnzeel, P. L., Uddin, M. & Koenderman, L. *Targeting neutrophilic inflammation in severe neutrophilic asthma: can we target the disease-relevant neutrophil phenotype?* *J. Leukoc. Biol.* **98**, 549-556 (2015).
5. Pillay, J., Tak, T., Kamp, V. M. & Koenderman, L. *Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences*. *Cell Mol. Life Sci.* **70**, 3813-3827 (2013).
6. Uribe-Querol, E. & Rosales, C. *Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin*. *J. Immunol. Res.* **2015**, 983698 (2015).
7. Hasenberg, A. et al. *Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes*. *Nat. Methods* **12**, 445-452 (2015).
8. Peters, N. C. et al. *In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand*

flies. *Science* **321**, 970-974 (2008).

9. Beerling, E., Ritsma, L., Vrisekoop, N., Derksen, P. W. & van Rheenen, J. Intravital microscopy: new insights into metastasis of tumors. *J. Cell. Sci.* **124**, 299-310 (2011).

10. Ritsma, L., Vrisekoop, N. & van Rheenen, J. In vivo imaging and histochemistry are combined in the cryosection labelling and intravital microscopy technique. *Nat. Commun.* **4**, 2366 (2013).

11. Torabi-Parizi, P. et al. Pathogen-related differences in the abundance of presented antigen are reflected in CD4+ T cell dynamic behavior and effector function in the lung. *J. Immunol.* **192**, 1651-1660 (2014).

12. van Golen, R. F. et al. The mechanisms and physiological relevance of glycocalyx degradation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 1098-1118 (2014).

13. Ritsma, L. et al. Intravital microscopy through an abdominal imaging window reveals a pre-micrometastasis stage during liver metastasis. *Sci. Transl. Med.* **4**, 158ra145 (2012).

14. Zomer, A. et al. Intravital imaging of cancer stem cell plasticity in mammary tumors. *Stem Cells* **31**, 602-606 (2013).

15. Beerling, E. et al. Plasticity between Epithelial and Mesenchymal States Unlinks EMT from Metastasis-Enhancing Stem Cell Capacity. *Cell. Rep.* **14**, 2281-2288 (2016).

16. Gibson, G. J., Loddenkemper, R., Lundback, B. & Sibille, Y. Respiratory health and disease in Europe: the new European Lung White Book. *Eur. Respir. J.* **42**, 559-563 (2013).

17. Pillay, J. et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.* **122**, 327-336 (2012).

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	Analysis of the development and function of neutrophils
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
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
	1	Analysis of the development and function of neutrophils

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The objective of this project is to gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and function of neutrophils in diverse inflammatory conditions. In order to study the origin and kinetics of the neutrophil populations we need to investigate the different relevant organs. Neutrophils develop in the bone marrow and occasionally the spleen and subsequently migrate through the blood to the inflammatory site. In addition, neutrophils are thought to reside in the lungs and liver (marginated pool). All these organs are therefore relevant for our studies. Whenever we will perform animal experiments we will therefore harvest multiple organs for our analysis. The strategy of this project is to combine human *in vitro* experiments with murine *ex vivo* and *in vivo* experiments. The readout of each animal experiment will consist of some or all of the following:

- descriptive data on single cell level (flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.)
- functional data (on specific functions of the neutrophil such as migration, phagocytosis, etc)
- intravital microscopy data
- descriptive data on disease progression (e.g. weight loss, microbial load, tumor size).

The methods for obtaining these readout parameters will be the same for all experiments in this proposal, but the inflammatory stimulus will differ per experiment. The purpose of our experiments is to compare the neutrophil populations between all the different inflammatory conditions.

Ex vivo analysis:

After the different interventions, tissues can be isolated and analyzed with microscopy. In addition cells can be isolated from the different tissues for further descriptive analysis (e.g. FACS of cell surface expression) and/or for functional assays (e.g. survival assay, bacterial killing capacity, T cell suppression capacity).

This *ex vivo* analysis will allow us to link surface markers between human and mouse neutrophils.

Surface marker expression and nuclear morphology allow us to distinguish different neutrophil subsets in mice, in multiple organs. We can see whether the different inflammatory conditions recruit the subsets with similar dynamics. Lastly, using functional *in vitro* assays we can investigate whether the subsets differ in their capacity e.g. to kill microbes and suppress T cell proliferation like we found in humans.

Intravital imaging:

Two different strategies will be used for the imaging experiments: (1) Imaging in an acute experiment under anesthesia and (2) implanting an imaging window (such as on the breast, skin, abdomen and skull) and repeatedly image through that window. For long-term studies the animal needs to be imaged by multiple imaging sessions, and therefore imaging windows are required. From experience we know that the implantation of intracutaneous windows does not lead to post-operative discomfort.

For some research questions, the tissue needs to be visualized frequently for a relative short-period of time (up to max 2 days). It is ethically undesirable to anesthetize the animal multiple times a day, so the animal will be constantly anesthetized. We have a lot of experience in the lab with these procedures, and only well trained researchers will perform these experiments. We have observed homeostatic neutrophils respond normally to stimuli under the conditions of these experiments.

In vivo imaging will allow us to study dynamic processes that are missed in static analysis. Imaging windows allow us to image the same mouse repeatedly over time as opposed to analyzing separate mice at different timepoints, greatly reducing the amount of animals needed. Additionally, this provides paired data, introducing less variation and therefore fewer animals are needed to get statistically significant results.

At the end point of intravital microscopy, tissues will always be analyzed *ex vivo* to reduce the number of mice required.

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

The objective of this project is to gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and function of neutrophils in diverse inflammatory conditions. Below the experimental approach per inflammatory stimulus and per intervention will be described. The choices about mice strains and numbers are further explained in B.

1. Inflammatory stimulus: LPS injection

Justification: LPS is a relatively simple model for acute inflammation with which we have a lot of experience *in vivo* in humans. It is in this model where we first described the different neutrophil subsets.

Description: Mice receive a single bolus of *E. coli* lipopolysaccharide intravenously (i.v.).

Mice: wildtype or intravital imaging strains

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours-days

Level of discomfort: mild or moderate

2. Inflammatory stimulus: Bacterial infection

Justification: Bacterial infection is a more complex, but more physiological relevant model for acute inflammation with which we have a lot of experience *in vitro* in humans.

Description: Mice are infected with (fluorescent) staphylococci via intradermal or intraperitoneal injection as described before^{1, 2}.

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to

analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – 2 weeks

Level of discomfort: moderate

3. Inflammatory stimulus: Viral infection

Justification: Viral infection is a complex physiological relevant model for inflammation with which we have some experience *in vitro* in humans.

Description: Mice are infected with influenza virus or rhinovirus 16 via intranasal administration, as performed before (Suzanne Bal, personal communication).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – 8 weeks

Level of discomfort: moderate

4. Inflammatory stimulus: Plastic particles

Justification: The effects of microplastics on human health are currently understudied. We have found neutrophils can engulf microplastics and now want to investigate their effect on neutrophil survival and function.

Description: Microplastics (plastic particles $\leq 1 \mu\text{m}$) are administered via subcutaneous injection, via addition to the drinking water, or via i.v. injection to mimic exposure routes in humans.

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – one year

Level of discomfort: mild or moderate

5. Inflammatory stimulus: Sterile injury

Justification: Sterile injury is known to recruit neutrophils without a pathogenic stimulus. Therefore this can act as a control for pathogen infection or as a model for damage-associated molecular pattern (DAMP) release.

Description: Under anesthesia, sterile injury is inflicted in the skin by needle insertion or laser damage

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours - days

Level of discomfort: mild or moderate

6. Inflammatory stimulus: Airway allergy

Justification: Allergy is a complex physiological relevant model for chronic inflammation with which we have a lot of experience in humans.

Description: Mice are sensitized and challenged with house dust mite by intranasal administration, as performed before (Suzanne Bal, personal communication).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: 2 – 8 weeks

Level of discomfort: mild or moderate

7. Inflammatory stimulus: Solid tumor growth

Justification: Cancer is a complex physiological relevant model for chronic inflammation. The suppressive neutrophil has been described in this model.

Description: We use genetic mouse models for breast or colorectal cancer, or transfer tumor cells/pieces from these mouse models to healthy mice of the same background to increase reproducibility or for intravital imaging.

Mice: Spontaneous tumor models or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – months

Level of discomfort: mild or moderate

The final level of discomfort also depends on the choice of the readout parameter. Harvesting of organs for *ex vivo* analysis or single session intravital imaging will result only in mild discomfort, but repeated intravital imaging will probably result in moderate discomfort.

To pinpoint the role of separate components of the inflammatory reaction, we will perform in these mice one or more of the following interventions:

1. Intervention: Administration of drugs/antibodies/inhibitors

Description: Drugs, antibodies, small molecules or chemicals are administered to mice via the appropriate route as described in literature (i.v., i.p., diet, etc).

Rationale: inhibit, stimulate, deplete or mimic components of the inflammatory reaction. E.g. by deleting neutrophils with anti-Ly6G antibodies we can delineate the role neutrophils play in disease progression or behavior of other cell types. The specific nature of these compounds will follow from our experimental results in the next five years.

For Inflammatory stimulus: 1-7

Extra experimental groups: treated vs. not treated.

Number of mice per group: as described per inflammatory stimulus.

Duration of intervention: seconds – minutes, possibly repeatedly

Level of discomfort: mild or moderate

2. Intervention: *In vivo* labeling

Description: Cells or structures in a living mouse are labelled by administration of: an antibody, fluorescent compounds for short term labeling of blood vessels, labelled erythrocytes to long-term label blood vessels, propidium iodide to monitor cell death, Hoechst to stain nuclei, or compounds which

incorporate into DNA to measure cell life span and proliferation such as deuterated water, deuterated glucose, EdU, or BrdU.

Rationale: During intravital imaging different cells and structures should be distinguished.

For Inflammatory stimulus: 1-7

Extra experimental groups: none.

Number of mice per group: as described per inflammatory stimulus.

Duration of intervention: seconds – months, possibly repeatedly

Level of discomfort: mild

3. Intervention: Adoptive transfer

Description: a single cell suspension of donor cells is administered i.v. to recipient mice.

Rationale: Firstly, (fluorescently) labeled cells will be transferred for tracking migration and function throughout the body. Cells harbouring a specific gene knockout will be transferred to study the role of this gene in specific organs/diseases. Human cells will be transferred to investigate the behavior of human neutrophils in an *in vivo*-like situation.

For Inflammatory stimulus: 1-7

Extra experimental groups: Donor mice & recipient mice.

Number of mice per group: ratio donor:recipient mostly 1:1, sometimes 2:1 or 3:1

Donor mice: wt mice, intravital imaging strains, knockout strains.

Recipient mice: wt mice, intravital imaging strains, knockout strains, immunodeficient mice. Irradiation of recipient mice to deplete their endogenous immune system might be required.

Duration of intervention: seconds – minutes

Level of discomfort: mild

4. Intervention: Bone marrow scaffold

Description: Biphasic calcium phosphate particles loaded with human MSCs will be implanted subcutaneously in immunodeficient mice to create a niche for hematopoiesis.

Rationale: To study neutrophil progenitors and differentiation. Intravital imaging of the bone marrow compartment is hard due to the solid thick nature of the surrounding bone. In a pilot study we have successfully placed an imaging window on a subcutaneous bone marrow scaffold allowing the visualization of cells in the bone marrow³.

For Inflammatory stimulus: 1-3,5,6

Extra experimental groups: With vs. without bone marrow scaffold.

Number of mice per group: as described per inflammatory stimulus

Duration of intervention: days - months

Level of discomfort: moderate during surgery, mild thereafter

5. Intervention: Splenectomy

Description: Surgery to remove the spleen is performed as described before⁴.

Rationale: Since we hypothesize that the spleen [REDACTED], we will study the effect of removing the spleen. Data from [REDACTED] suggest that the number of [REDACTED] is decreased.

For Inflammatory stimulus: 1-3,5,6

Extra experimental groups: Splenectomized vs. non-splenectomized

Number of mice per group: as described per inflammatory stimulus.

Duration of intervention: hours

Level of discomfort: moderate during surgery, mild thereafter

Now that all models and interventions have been described we will describe some examples of how these experimental procedures can help us to achieve some of our milestones:

Milestones:

- i. Phenotypic definition of neutrophil subsets (surface marker expression, nuclear morphology, etc.)
- ii. Functional definition of neutrophil subsets (better/worse in killing, pro- or anti-inflammatory, etc.)
- iii. To know whether phenotype and function of neutrophils is the same throughout a range of inflammatory disorders
- iv. To know the distribution pattern of neutrophils/neutrophil subsets after leaving the bone marrow, in homeostasis vs. inflammatory conditions

Milestones i-iv can be achieved by comparing the morphology and cell surface expression of neutrophils in bone marrow, spleen, blood, liver, lung and inflammatory site after the different inflammatory stimuli compared to controls. Next, subsets found will be tested in vitro functional

assays. Subsequently, the in vivo functionality can be tested by intravital microscopy in combination with adoptive transfer (intervention 2 and 3) of the different subset and/or depletion of the different subsets (intervention 1).

- v. To know the life-span of murine neutrophils/neutrophil subsets, in homeostasis vs. inflammatory conditions
- vi. To know where [REDACTED]
Combine the phenotypic and functional neutrophil subsets with in vivo labeling (intervention 2) in order to determine their life span. This will also reveal whether the subsets all have the same age or if one is younger than the other, giving clues if one subset is likely to differentiate from the other.
- vii. To confirm whether [REDACTED] is a [REDACTED] and neutrophil [REDACTED]
Combine the phenotypic and functional neutrophil subsets with splenectomy (intervention 5) in order to determine the role of the spleen [REDACTED].
- viii. To know whether inhibition of neutrophils/neutrophil subsets has an effect on tumor growth
Combine tumor models with neutrophil depletion (intervention 1).

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

When possible, blinding and randomization will be used to prevent bias as much as possible. For example, videos obtained with intravital imaging can be coded by an independent colleague before image analysis by the researcher.

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$. Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based on literature and/or years of experience with similar type of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

B. The animals

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

Species: *Mus musculus*

Origin: Common breeding facility (Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium) at Utrecht University/Hubrecht institute/external licensed breeders

Estimated numbers: max. 3000

Life stages: adults

Species

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand neutrophil development, homeostasis and response to inflammation in the context of the whole organism. For the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) physiology is more extensively characterized than other animal models; (2) a large number of relevant transgenic and knock out lines is already available; (3) a large number of relevant antibodies and other compounds is already available; (4) our research shows murine neutrophils are representative for human neutrophils; (5) many procedures for intravital imaging have already been described. The zebrafish is also an animal widely used for intravital imaging, but the differentiation of zebrafish neutrophils is much less similar to human neutrophils. Since mice are mammals too, they are closer to the human.

Mice strains used are amongst others:

- Wildtype BL/6
- Wildtype Balb/c
- Wildtype FVB
- LysM-GFP mice; for visualization of fluorescent neutrophils in intravital imaging. We are already working with this strain.
- Catchup^{IVM} mice (Ly6G-Cre + Rosa-Td-Tomato); for visualization of fluorescent neutrophils in intravital imaging and for conditional knockouts in neutrophils⁵. This strain was very recently

created, we want to import this strain. If the results will be superior to LysM-GFP mice, we will switch to this strain.

- MRP/S100A8-Tg-EGFP-Cre; for conditional knockouts in neutrophil progenitors⁶. We want to import this strain. As opposed to the Catchup^{IVM} mice, Cre recombinase is expressed in granulocyte-macrophage progenitors in the bone marrow.
- Knockout mice (e.g. CD11b-knockout mice); to investigate the role of a specific gene or protein
- Tumor models such as MMTV-PyMT, MMTV-Wnt1 or C26 colorectal cancer mice. In our currently running animal experiments we are comparing different tumor models with each other, to optimize for future experiments. Therefore we have not completely decided which tumor models we will use in the next five years, but it will be a model that is similar in execution and discomfort as the here mentioned examples.
- Humanized mice⁷ or immunocompromised mice (e.g. NSG mice); to investigate the behavior of human neutrophils in an *in vivo*-like situation.

If the required genetically modified mouse is not available, we will obtain this model by generating, importing or by crossing existing models. Other strains will be used when in the next five years, novel strains are described or created that are very relevant to our hypotheses.

Estimated numbers

Our experiments can be divided into:

- Descriptive analysis (5-15 animals x max 5 time points = max 75 animals)
- Functional assays (5-15 animals x max 5 time points = max 75 animals)
- Intravital imaging (5-10 animals)

This totals to 55-160 animals

However, we have 7 inflammatory stimuli, 5 interventions and no intervention per stimuli = 42 conditions.

So for the total we have to multiply the 55-160 animals with 42 = 2310-6720 animals

However, these numbers are overestimations because:

- Controls can be shared between experiments when these are performed simultaneously
- Descriptive single cell and functional assays will be combined when neutrophil numbers allow this
- When differences between groups turn out to be very striking, we do not need the maximum number of mice per group
- Successful pilot studies may be included in the dataset

Therefore we do not anticipate we will need more than 2500 mice for the experiments.

Additionally, a number of ca. 500 mice is needed for:

- Maintenance of breeding
- Creation of new knockout models
- Pilot studies for validation of models/techniques
- Training of new personnel or new techniques
- Rederivation of imported strains via embryo transfer
- To compensate for unforeseen loss of animals (max 10%, e.g. due to location not suitable for imaging, problems with the window)

Mice that become surplus during breeding, will be used for pilot studies and training purposes.

Together we therefore anticipate we need a grand total of 3000 mice.

Sex

In general, we will try to use both male and female mice. However, it is clear that the immune response of males and females can greatly differ⁸. Therefore, we will perform pilot studies to ensure that the sex of the animal does not pose a bias in answering the particular research question. These pilots may prove it necessary to use only one sex within one animal experiment, to be able to reliably compare experimental groups.

One clear exception is the MMTV-PyMT breast cancer model; in this model only female mice consistently develop breast tumors.

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:

Immune responses are highly complex and multifaceted. Multiple compartments such as the bone marrow, spleen, endothelial wall and inflamed tissue interact. Certain aspects of the immune response can be separately simulated *in vitro*, but it is not yet possible to study the full course of infection and the elicited immune response *in vitro*. This requires animal models. Similarly, the use of experimental interventions to test their potential beneficial impact on the course of disease can only be assessed in animal models. Clearly, such experimental interventions cannot be performed in patients, while *in vitro* studies with isolated human cells do not capture the full complexity of infection. However, before turning to mice, we will first study human cells *in vitro* to ensure we only perform the most relevant experiments in mice.

Reduction:

Intravital imaging using imaging windows allows us to image the same mouse repeatedly over time as opposed to analyzing separate mice at different timepoints greatly reducing the amount of animals needed. Additionally, this provides paired data, introducing less variation and therefore fewer animals are needed to get statistical significant results. Statistical power calculation based on our own previous experience and literature will be used to determine the optimal number of mice for each experimental group. Moreover, experiments will be performed sequentially, based on the described go/no-go decisions, via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative. Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible.

Refinement:

Except for mice with windows, where co-housing can give problems, mice will be housed in groups in cages. Nesting opportunities will always be provided. Mice with windows will be monitored at least twice a week, mice after bacterial or viral infection will be monitored at least every other day, more if necessary, for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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

As described under refinement, mice welfare will be regularly monitored. Mice reaching the humane endpoints or otherwise suffering from severe discomfort will be euthanized. New personnel will be trained to recognize discomfort in mice according to current guidelines (e.g. ⁹). Surgical exposure will be performed under aseptic conditions using sterile instruments. Heating devices will be used to ensure a stable body temperature of the mouse during anaesthesia. Personnel conducting the surgeries is first properly trained, starting with training on cadavers.

Surgical exposure will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Pre- and post-procedural analgesia will be used when indicated or when pain-related behavior is observed. However, common analgesics such as opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to significantly alter the immune response¹⁰⁻¹². Since this is our main research topic, we might sometimes refrain from using analgesia. It may be necessary to do pilot studies to prove whether analgesics pose a bias in answering our particular research question. From literature, it seems buprenorphine may be a reasonable candidate¹³.

There are no expected adverse effects on the environment.

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.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

Mice with an imaging window will be housed individually to prevent other mice from biting or damaging the window.

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Surgical exposure will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Pre- and post-procedural analgesia will be used when indicated or when pain-related behavior is observed. However, common analgesics such as opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to significantly alter the immune response¹⁰⁻¹². Since this is our main research topic, we might sometimes refrain from using analgesia. However, pain can also influence the immune system. Therefore, it may be necessary to do pilot studies to prove whether analgesics pose a bias in answering our particular research question.

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

Surgical exposure will be performed under aseptic conditions using sterile instruments. Heating devices will be used to ensure a stable body temperature of the mouse during anaesthesia. Personnel conducting the surgeries is first properly trained, starting with training on cadavers. Before, during and after surgery adequate anesthesia and analgesia (e.g. isoflurane and buprenorphine) will be used, according to experience as well as published protocols. New personnel will be trained to recognize discomfort in mice according to current guidelines (e.g. ⁹).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will consist of a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than moderate discomfort. Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. All relevant scientific data can and will be gathered *before* the cancer, infection or allergy studies reach a level of severe discomfort. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized. It is expected that no animals (0%) will be experiencing more than mild discomfort due to the genetic

modification. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect. So, in all cases, animals will be carefully monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day and analyzed when possible. Animals may lose their window (<5%). In the vast majority of these animals (>95%), we notice signs of detachment of the window far before it becomes loose, and the mice will be sacrificed. In the remaining animals, the window loss will be noticed within 24hrs and the mouse will be immediately sacrificed.

Explain why these effects may emerge.

Tumor development, inflicted inflammation, genetic alterations and administration of compounds/ drugs/ chemicals/ toxins.

It is unclear why some animals may lose their windows.

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

Mice with windows will be monitored at least twice a week, mice after bacterial or viral infection will be monitored at least every other day, more if necessary, for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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.

As described in D, F, H and I, the experiments will be set-up in such a way that the incidence of reaching the humane end-point is kept to a minimum.

Weight loss (>20% in comparison with control or original weight or 15% weight loss in two days), reaching a score of 4 on the illness scale (specified below), severe shortness of breath, or loss of window is set as an humane end point. For all tumor models the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed, taking into account e.g. the size, location and ulceration of the tumor(s).

Next to model-specific parameters, an illness grading scale will always be used to score a set of clinical features detected in mice with different degrees of illness:

0: healthy

1: barely ruffled fur

2: ruffled fur, but active

3: ruffled fur and inactive

4: ruffled fur, inactive, hunched, and gaunt

5: dead

Indicate the likely incidence.

Expected <5% and <1day.

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative level of discomfort is dependent on the intervention, the read-out and the animal model. The discomfort of these three range from mild to moderate. Therefore combinations of these result in moderate discomfort for the majority (~90%) of animals.

References for the whole appendix

1. Liese, J., Rooijackers, S. H., van Strijp, J. A., Novick, R. P. & Dustin, M. L. Intravital two-photon microscopy of host-pathogen interactions in a mouse model of Staphylococcus aureus skin abscess formation. *Cell. Microbiol.* **15**, 891-909 (2013).
2. Spaan, A. N. *et al.* The staphylococcal toxins gamma-haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nat. Commun.* **5**, 5438 (2014).
3. Groen, R. W. *et al.* Reconstructing the human hematopoietic niche in immunodeficient mice: opportunities for studying primary multiple myeloma. *Blood* **120**, e9-e16 (2012).
4. Levy, L. *et al.* Splenectomy inhibits non-small cell lung cancer growth by modulating anti-tumor adaptive and innate immune response. *Oncoimmunology* **4**, e998469 (2015).
5. Hasenberg, A. *et al.* Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nat. Methods* **12**, 445-452 (2015).
6. Lagasse, E. & Weissman, I. L. Bcl-2 Inhibits Apoptosis of Neutrophils but Not their Engulfment by Macrophages. *J.*

Exp. Med. **179**, 1047-1052 (1994).

7. Coughlan, A. M., Freeley, S. J. & Robson, M. G. Animal models of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **169**, 229-237 (2012).

8. Gubbels Bupp, M. R. Sex, the aging immune system, and chronic disease. *Cell. Immunol.* **294**, 102-110 (2015).

9. Burkholder, T., Foltz, C., Karlsson, E., Linton, C. G. & Smith, J. M. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **2**, 145-165 (2012).

10. Salimi, V. *et al.* Opioid receptors control viral replication in the airways. *Crit. Care Med.* **41**, 205-214 (2013).

11. Sacerdote, P. Opioids and the immune system. *Palliat. Med.* **20 Suppl 1**, s9-15 (2006).

12. Hish, G. A., Diaz, J. A., Hawley, A. E., Myers, D. D. & Lester, P. A. Effects of Analgesic Use on Inflammation and Hematology in a Murine Model of Venous Thrombosis. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **53**, 485-493 (2014).

13. Mundt, S., Groettrup, M. & Basler, M. Analgesia in mice with experimental meningitis reduces pain without altering immune parameters. *ALTEX* **32**, 183-189 (2015).

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

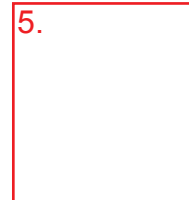
X Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

In order to obtain organs and isolated cells for *ex vivo* analysis the mice must first be 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

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
AVD115002016714

Bijlagen

2

Datum 13 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 13 oktober 2016. Het gaat om uw project "Neutrophil subsets en health and disease". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002016714. 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:

13 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD115002016714

Datum:
13 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD115002016714

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

Datum:
13 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD115002016714

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: OIO
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 november 2016
Geplande einddatum: 31 oktober 2021
Titel project: Neutrophil subsets en health and disease
Titel niet-technische samenvatting: Neutrofielen sybtypes in gezondheid en ziekte
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.584,-
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 oktober 2016

Datum:
13 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD115002016714



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80011
3508 TA UTRECHT


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD115002016714
Bijlagen
2

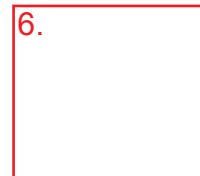
Datum 13 januari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 13 januari 2017
Vervaldatum: 12 februari 2017
Factuurnummer: 16700714
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD115002016714	€ 1.584,00

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

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
AVD115002016714

Datum 13 januari 2017

Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte Prof. 

Op 13 oktober 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Neutrophil subsets en health and disease" met aanvraagnummer AVD115002016714. 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 beschrijft meerdere modellen in elke bijlage dierproeven. Kunt u per bijlage dierproeven, per handeling, voor elk model/inflammatoire stimulus aangeven wat de exacte handelingen zijn met bijbehorende ongerief per handeling en het cumulatief ongerief per model voor de verschillende dieren, inclusief dieraantallen. U kunt dit bijvoorbeeld in tabelvorm doen.
- 2) De onderbouwing van de dieraantallen zijn gebaseerd op 5-15 dieren per groep. Daarnaast geeft u aan veel ervaring te hebben met de te gebruiken diermodellen, waardoor het ons inziens mogelijk zou moeten zijn deze aantallen nauwkeuriger in te schatten. Graag een betere inschatting van het aantal dieren weergeven.
- 3) Wordt intranasale toediening van de virussen en huisstofmijt onder anesthesie uitgevoerd?
- 4) U beschrijft verschillende inflammatoire stimuli in uw bijlagen. Kunt u voor

alle stimuli weergeven wat de gevolgen zijn van deze stimuli voor de dieren?
Welke symptomen kunnen zij hierbij krijgen?

Datum:
13 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD115002016714

5) U beschrijft een extra 500 muizen voor o.a. onderhoud fok, maken van knock-out modellen, pilot studies etc. Kunt u voor elk van deze doelen de geschatte aantallen geven en de handelingen die deze dieren zullen ondergaan. Voor fok en creatie van nieuwe muizenlijnen is een aparte bijlage wenselijk.

6) Kunt u een betere beschrijving geven van de handelingen aan en het ongerief voor de dieren voor implanteren van Bone marrow scaffolds?

7) Kunt u een betere beschrijving geven van de handelingen aan en het ongerief voor de dieren voor implanteren van imaging windows?

Leges

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

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Geachte CCD,

Hierbij stuur ik u de extra gevraagde informatie toe met betrekking tot de aanvraag "Neutrophil subsets in health and disease" met aanvraagnummer AVD115002016714. Hieronder kunt u een korte toelichting vinden op uw vragen. Tevens kunt u gedetailleerde aanpassingen in rode tekst vinden in de betreffende bijlagen.

- 1) U beschrijft meerdere modellen in elke bijlage dierproeven. Kunt u per bijlage dierproeven, per handeling, voor elk model/inflammatoire stimulus aangeven wat de exacte handelingen zijn met bijbehorende ongerief per handeling en het cumulatief ongerief per model voor de verschillende dieren, inclusief dieraantallen. U kunt dit bijvoorbeeld in tabelvorm doen.**

Zoals gevraagd heb ik voor elk model/ inflammatoire stimulus gedetailleerder de exacte handelingen met bijbehorende symptomen en ongerief in rode tekst geïnccludeerd. Dit project omschrijft onderzoek naar neutrofielen subsets in de diverse inflammatoire situaties. Het is een exploratief onderzoek wat we initieel breed inzetten. Wellicht zullen we de subsets maar in een aantal van de modellen vinden en zullen we juist die modellen gebruiken in vervolg experimenten. Gezien het fundamentele karakter van dit onderzoek is het onmogelijk vooraf aan te geven hoeveel dieren precies per model gebruikt zullen gaan worden. Uiteraard zullen er meerdere go/ no go momenten worden opgenomen in de werkprotocollen. Een uitgewerkt voorbeeld van deze aanpak kunt u vinden in Scheme 2 in ons project proposal.

- 2) De onderbouwing van de dieraantallen zijn gebaseerd op 5-15 dieren per groep. Daarnaast geeft u aan veel ervaring te hebben met de te gebruiken diermodellen, waardoor het ons inziens mogelijk zou moeten zijn deze aantallen nauwkeuriger in te schatten. Graag een betere inschatting van het aantal dieren weergeven.**

Ik begrijp de verwarring. We hebben zeker ervaring met de verschillende diermodellen (bijv viral infections: Torabi-Parizi P JI 2014 & Mandl JN Immunity 2013/ tumorgroei en intravital imaging: Ritsma L STM 2012 en Zomer A Stem Cells 2013), echter we weten nog niet of de verschillende neutrofielen subsets in de diverse inflammatoire situaties te vinden zijn, in welke mate en wat de variatie daarin is. In een gezonde muis zijn niet veel neutrofielen in het bloed aanwezig. Het zou dus kunnen dat we voor een complete beschrijvende analyse aan 1 muis niet genoeg hebben. We verwachten wel een toename van neutrofielen na een inflammatoire stimulus. We geven in sectie 2B van de bijlages ook aan dat deze aantallen waarschijnlijk een overschatting zijn. We kunnen helaas pas een betere inschatting geven van het aantal dieren als we meer informatie hebben over de neutrofielen subsets na iedere inflammatoire stimulus. Uiteraard zullen de individuele werkprotocollen na voortschrijdend inzicht wel een betere inschatting bevatten.

- 3) Wordt intranasale toediening van de virussen en huisstofmijt onder anesthesie uitgevoerd?**

De intranasale toediening zal onder anesthesie uitgevoerd worden. Dit is ook in rode tekst toegevoegd aan de bijlagen.

- 4) U beschrijft verschillende inflammatoire stimuli in uw bijlagen. Kunt u voor alle stimuli weergeven wat de gevolgen zijn van deze stimuli voor de dieren?**

Zoals gevraagd heb ik voor elk model/ inflammatoire stimulus de gevolgen van de stimulus in rode tekst geïnccludeerd.

- 5) Welke symptomen kunnen zij hierbij krijgen?**

Zoals gevraagd heb ik voor elk model/ inflammatoire stimulus de symptomen van de stimulus in rode tekst geïnccludeerd.

- 6) U beschrijft een extra 500 muizen voor o.a. onderhoud fok, maken van knock-out modellen, pilot studies etc. Kunt u voor elk van deze doelen de geschatte aantallen geven en de handelingen die deze dieren zullen ondergaan. Voor fok en creatie van nieuwe muizenlijnen is een aparte bijlage wenselijk.**

De fok betreft bestaande genetische tumormodellen (beschreven onder stimulus 7) en bestaande knock-out modellen. Deze diermodellen zijn reeds aanwezig of zullen geïmporteerd worden. We

hebben het maken van knock-out modellen geincludeerd omdat we de mogelijkheid wilden hebben om eventuele verschillen in subtype neutrofielen in meer detail te bestuderen. Het is in deze fase van het onderzoek echter nog niet bekend om welke knock-out modellen het gaat. Mijn voorstel is om dit deel er op dit moment uit te laten en een amendement in te sturen zodra dit relevant wordt. Ik heb de overige muizen beter getracht te specificeren in rode tekst, maar ik wil benadrukken dat dit schattingen zijn omdat nog niet duidelijk is hoeveel pilot experimenten nodig zijn, hoeveel onderzoekers op het project ingewerkt moeten worden en of we tumormodellen zullen gaan fokken (of dat we in plaats daarvan tumor stukjes zullen gaan implanteren in gezonde muizen). De muizen zullen geen andere handelingen ondergaan dan beschreven in de project aanvraag.

7) Kunt u een betere beschrijving geven van de handelingen aan en het ongerief voor de dieren voor implanteren van Bone marrow scaffolds?

Zie rode tekst in bijlage 4.3 sectie 2A.

8) Kunt u een betere beschrijving geven van de handelingen aan en het ongerief voor de dieren voor implanteren van imaging windows?

Zie rode tekst in bijlages 4.1/ 4.2/ 4.3 en 4.4 sectie 2A.

Ik hoop u hierbij voldoende te hebben geïnformeerd. Mochten er nog vragen zijn dan hoor ik het graag.

Vriendelijke groet,

██████████



Form Project proposal

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

1 General information

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

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

The neutrophilic granulocyte is the first line of defense against invaders such as bacteria, fungi, foreign particles and aberrant cells. As the most abundant white blood cell, it continuously circulates the blood until a signal causes it to extravasate towards the tissue. In the tissue upon phagocytosis the neutrophil will exploit the content of its granules to degrade the foreign invader or cell debris. Besides pathogens

and cell debris, we will also further zoom in on one type of foreign particles that neutrophils can encounter in the human body, microplastics. These $\leq 1\mu\text{m}$ plastic particles are very prevalent in our environment (eg in our drinking water and aquatic animals via erosion from plastic litter), but research into health effects in mammals is virtually non-existent.

Neutrophils have always been described as a homogeneous population of short-lived cells. However, recent publications of our research group and others challenge this view. Our group described that neutrophils have a longer lifespan than previously thought. And whereas the population in blood in homeostasis might be homogeneous, various stimuli disturbing homeostasis lead to heterogeneity in phenotype and function. Our group showed that if healthy humans receive an LPS injection, immature, banded neutrophils appear in the blood, which are much better at killing bacteria than mature neutrophils (Leliefeld *et al.*, manuscript in preparation).

Recently, neutrophils have been described to play a role in the pathogenesis of various human diseases such as cardiovascular disease, cancer, auto-immune diseases and allergy¹⁻⁴. Linked to these conditions, several neutrophil subsets have been newly described such as low-density granulocytes, granulocytic myeloid-derived suppressor cells (G-MDSC), tumor-associated neutrophils (TAN), and hypersegmented neutrophils⁵. Although we know that homeostatic neutrophils in humans and mice behave very similar, the similarity of neutrophil subsets in humans and mice is poorly described.

In disease, neutrophils can play a beneficial but also often a detrimental role. For example, neutrophils have been described to both promote and inhibit tumor progression and metastasis⁶. They can be both pro- and anti-inflammatory⁵. At the wrong time or the wrong place, neutrophil activation and degranulation will result in overwhelming inflammation and major tissue damage. Neutrophils present in a tumor are correlated with a worse prognosis, but the mechanisms behind this correlation are unclear⁶. The ability to steer neutrophil function, activation or localization from the outside would be beneficial for many diseases. The treatment of cancer would likely benefit from targeting only the pro-tumor neutrophil subset as opposed to all neutrophils. In contrast, the treatment of asthma would greatly benefit from targeting only the pro-inflammatory neutrophil subset.

But the basic knowledge on the timing, localization or even origin of neutrophil subsets is lacking, because we cannot easily sample human tissues. We know neutrophils develop in the bone marrow, but the time they need to develop is uncertain. We know neutrophils are able to migrate to lymph nodes via lymph vessels, but the signal driving them as well as their function in the lymph node are unclear. We know different subtypes of neutrophils have different functions, but when and where the differentiation of these subsets starts to diverge is again unclear.

To answer these types of questions, we need to gain a better understanding of the complex interplay of the entities that can guide the neutrophil: most importantly the bone marrow, spleen, endothelium, inflamed tissue, tumor cells, foreign particles, other immune cells and the neutrophil itself. As well, we think it is important to understand whether neutrophil subsets observed upon inflammation are the same throughout the range of inflammatory disorders. If they have a different phenotype and/or function for different types of disorders, that would be highly relevant for designing new therapies.

Understanding how and where the different neutrophil subsets arise in inflammatory conditions and what mechanisms underlie their function is essential to determine their role in disease and to establish potential treatment options. Redirection of immune responses has an enormous societal and scientific relevance as inflammation-associated diseases (including cardiovascular disease, cancer, auto-immunity and allergy) are associated with major pathology and morbidity.

In this research project we will combine data of healthy mice, mice with acute inflammation and mice with chronic inflammation, to help us understand why and when different neutrophil subsets are developed and recruited. Even if murine neutrophil subsets do not resemble those in human, this data will together show whether the response of the neutrophil to inflammation is generic, or tailored to the stimulus. Examples of inflammatory stimuli are pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), damage-associated molecular patterns (DAMPs) and tumor antigens. At the same time, we will have a better idea whether inhibiting or stimulating neutrophils in these specific conditions would be beneficial or detrimental to the disease progression.

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 gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and

function of neutrophils in inflammatory conditions. These research questions will therefore be addressed:

- Is the neutrophil population heterogeneous in morphology?
- Is the neutrophil population heterogeneous in function?
- Does the migration & distribution of neutrophils throughout the body depend on the type of inflammatory stimulus?
- Does the differentiation of neutrophils depend on the type of inflammatory stimulus or organ?
- Does the function of neutrophils depend on the type of inflammatory stimulus?
- Does the life-span of neutrophils depend on the type of inflammatory stimulus?
- Does the interaction of neutrophils differ per type of inflammatory stimulus?
- Does the phagocytosis of microplastics influence neutrophil function?

From human data, we know that heterogeneous neutrophil subsets appear in the blood upon strong immune stimulation such as LPS injection, cancer, trauma or viral infection. However, these different conditions make the subsets appear in the circulation at a different timing. Our preliminary data shows neutrophil heterogeneity is also induced in mice upon trauma (acute inflammation) or solid tumor growth (chronic inflammation).

In healthy mice, mice with acute inflammation and mice with chronic inflammation, we will analyze the phenotype and function of the neutrophils *ex vivo*, crucially supported by analysis of the kinetics of murine neutrophils *in vivo*. *Ex vivo* analysis is aided by our longstanding experience with flow cytometry and assays on neutrophil function (migration, phagocytosis, ROS formation, degranulation, etc., etc.). In the kinetics studies we will study the distribution of neutrophils by *ex vivo* analysis of the neutrophils in different organs, as well as the migration of neutrophils by intravital imaging. In these intravital imaging experiments, neutrophil migration is easily tracked in mice that produce fluorescent neutrophils such as the LysM-GFP or the Catchup^{IVM} mouse^{7,8}.

There are several other reasons why we are confident that we can achieve our aims: Our group is embedded in the Laboratory of Translational Immunology (LTI), which is a center-of-excellence on fundamental and translational immunological research. Since the clinic is very close and our medical PhD students closely collaborate with clinical doctors, we can obtain patient material for research. The complementary use of patient material and well-defined animal models will ensure the successful completion of this project. The LTI provides core facilities for various high-end techniques such as histology, fluorescent confocal imaging, intravital imaging and flow cytometry. Moreover, the animal facility offers dedicated staff providing the regular housing of the animals and support and counsels the scientist in their experiments. Within our group, only trained and experienced people perform experiments.

Our research and experiments are constantly evaluated within our group, and by various other groups within our institute and campus. To aid our research on microplastics, we collaborate with experts from different fields in the TA-COAST consortium. Over the last few years, we have built up a repertoire of state-of-the-art *in vivo* imaging techniques to study immune cells in living mice. This has led to many new discoveries and breakthroughs published in scientific journals⁹⁻¹⁵. Our research is funded by major funding agencies. Our embedding in an excellent scientific environment, our unique techniques and approaches, and our previous achievements make it very likely that with the experiments described in this project we will make large contributions to our main research questions.

3.3 Relevance

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

The enormous burden of inflammation-associated diseases (including cardiovascular disease, cancer, auto-immunity and allergy) worldwide is aggravated by lack of adequate treatment options. This is due to insufficient knowledge about the common player in virtually all inflammatory processes: the neutrophil. The burden of neutrophil-mediated pathology is high, but no specific therapy is currently available. The estimated costs to society (EU) are now above 250 billion euros annually, which will only rise in the future¹⁶. Recent insights show that the neutrophil can be both pro- and anti-inflammatory⁵. Inhibition of pro-inflammatory neutrophils and activation of anti-inflammatory neutrophils will be beneficial for patients in pro-inflammatory states, whereas patients with a suppressed immune system such as in cancer or after acute severe inflammation may profit from a reverse approach. The lack of knowledge regarding this emerging concept has to date precluded the development and translation of the manipulation of neutrophils into a clinical application. Successful manipulation of the different neutrophil subsets will be widely applicable to a range of different inflammatory diseases.

Pollution of the water environment with microplastics by erosion of plastic litter is a pressing problem that has received a lot of attention in the last few years. It has been shown that microplastics end up in

our food chain, but their effects on human health are currently understudied. To assess their effects on human health we look at neutrophils, since they are specialized in taking up foreign particles. Our preliminary human *in vitro* data shows that neutrophils are also able to engulf microplastics. These microplastics are likely not degraded by the neutrophils and might have an effect on their survival and their capacity to subsequently kill pathogens. If we demonstrate that microplastics adversely affect human health, evidence-based regulatory measures can be formulated.

3.4 Research strategy

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

The strategy of this project is to combine human *in vitro* experiments with murine *ex vivo* and *in vivo* experiments. The readout of each animal experiment will consist of some or all of the following:

- descriptive data on single cell level (flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.)
- functional data (on specific functions of the neutrophil such as migration, phagocytosis, etc)
- intravital microscopy data
- descriptive data on disease progression (e.g. weight loss, microbial load, tumor size).

The methods for obtaining these readout parameters will be the same for all experiments in this proposal, but the inflammatory stimulus will differ per experiment. We think the combination of several inflammatory stimuli is the strength of this project, because currently it is unknown whether neutrophils respond the same to diverse inflammatory signals (e.g. PAMPs, DAMPs, tumor antigens).

Supported by our own research on human material, pigs and mice, we have a number of hypotheses that we will start with. However, since our research is mostly fundamental and novel, we cannot know whether these hypotheses will prove correct. In the next five years, human data will be combined with data from the animal experiments to adapt our hypotheses when necessary.

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.

Firstly, we want to investigate whether the morphology and function of murine neutrophil subsets is similar to the subsets we described in humans (¹⁷, Tak *et al.* submitted, Leliefeld *et al.* manuscript in preparation). Therefore we will start with an experiment of LPS injection in mice similar to our experiments with LPS injection in humans. But to extend our findings to more physiological inflammatory stimuli, we want to use bacterial infection, viral infection, plastic particles or sterile injury. To look at stimuli specific for chronic inflammation, we want to use animals with solid tumor growth or airway allergy, two relevant diseases with a significant but opposite role for neutrophils. Homeostatic neutrophils will be analyzed *ex vivo* and *in vivo* and compared to the neutrophils arising in an inflammatory state. As described in 3.1, neutrophil behavior is determined by a complex interplay of the bone marrow, spleen, endothelium, inflamed tissue, tumor cells, foreign particles, other immune cells and the neutrophil itself. To study this system, we want to modify these entities one by one. Therefore we will perform one or more of the following interventions in these mice:

- **A:** Administration of drugs/antibodies/inhibitors/labels
We might be able to rescue or mimic the phenotypes of the neutrophil subsets and therefore further identify the function of these cells *in vivo*. If possible and/or relevant, we will always test these compounds first *in vitro* and in case relevant effects are observed shift to in the *in vivo* experiments. Other examples include *in vivo* antibody administration, injection of fluorescent compounds for short term labeling of blood vessels, transfer of labelled erythrocytes to long-term label blood vessels, injection of propidium iodide to monitor cell death, injection of Hoechst to stain nuclei, administration of compounds which incorporate into DNA to measure cell life span and proliferation such as deuterated water, deuterated glucose, EdU or BrdU.
- **B:** Adoptive transfer
To study human cells *in vivo* or to, for instance, compare wildtype neutrophils with neutrophils that have a mutation we need to adoptively transfer donor neutrophils into recipient mice. Irradiation of recipient mice to deplete their endogenous immune system might be required. Also (fluorescently) labeled cells might be transferred for tracking purposes.
- **C:** Bone marrow scaffold
To study neutrophil progenitors and differentiation. Intravital imaging of the bone marrow compartment is hard due to the solid thick nature of the surrounding bone. In a pilot study we have successfully placed an imaging window on a subcutaneous bone marrow scaffold [Groen Blood 2012] allowing the visualization of cells in the bone marrow.
- **D:** Splenectomy
To study neutrophil [redacted] and [redacted] in the spleen. Literature as well as our

preliminary data suggests that some [REDACTED]
Additionally, [REDACTED] with [REDACTED], especially [REDACTED], may [REDACTED]
[REDACTED] To study how these subtypes or cell-cell interactions affect the immune system as a whole, we are interested in applying our inflammatory stimuli in splenectomized animals.

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.

For most experiments we first consider *ex vivo* experiments (mild discomfort), before we consider intravital imaging experiments (mild to moderate discomfort). In some experiments we first consider intravital imaging, either because some questions can only be answered by imaging the same tissue over multiple imaging sessions, or because it significantly reduces the number of required mice (can be up to a reduction of 20x); multiple time points can be measured in one individual, and there is no inter-mice variation. After completion of the intravital imaging experiments, cells, tissues and organs will be isolated and analyzed to reduce the number of mice required. For using the different inflammatory stimuli mentioned under 3.4.2, the experiments for optimization and set-up will be the same.

Milestones:

- i. Phenotypic definition of neutrophil subsets (surface marker expression, nuclear morphology, etc.)
- ii. Functional definition of neutrophil subsets (better/worse in killing, pro- or anti-inflammatory, etc.)

*Go/no-go moment: When we do not find distinct subsets in the mouse but a homogenous neutrophil population, this milestone will not be pursued:

- iii. To know where [REDACTED]

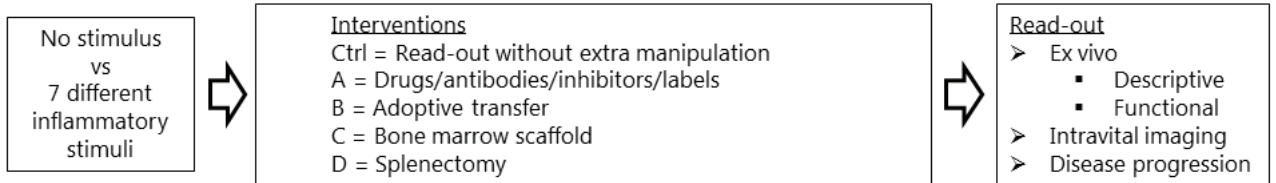
But these milestones below are independent of the go/no-go moment:

- iv. To know whether phenotype and function of neutrophils is the same throughout a range of inflammatory disorders
- v. To know whether the interaction between the neutrophils and the inflammatory stimulus is the same throughout a range of inflammatory disorders
- vi. To know the distribution pattern of neutrophils/neutrophil subsets after leaving the bone marrow, in homeostasis vs. inflammatory conditions
- vii. To know the life-span of murine neutrophils/neutrophil subsets, in homeostasis vs. inflammatory conditions
- viii. To confirm whether neutrophils/neutrophil subsets continue migrating towards other organs after phagocytosis of pathogens in infected tissue
- ix. To confirm whether the [REDACTED]
- x. To know whether inhibition of neutrophils/neutrophil subsets can relieve symptoms in allergic airway disease
- xi. To know whether inhibition of neutrophils/neutrophil subsets has an effect on tumor growth

These milestones can be reached simultaneously and do not depend on each other. When we do not reach the first three milestones, i.e. when we do not find distinct subsets in the mouse but a homogenous neutrophil population, then the latter milestones remain valuable for this homogenous neutrophil population.

To further clarify how different inflammatory stimuli will be combined with the interventions described in 3.4.2 to reach these milestones, we provided Scheme 1.

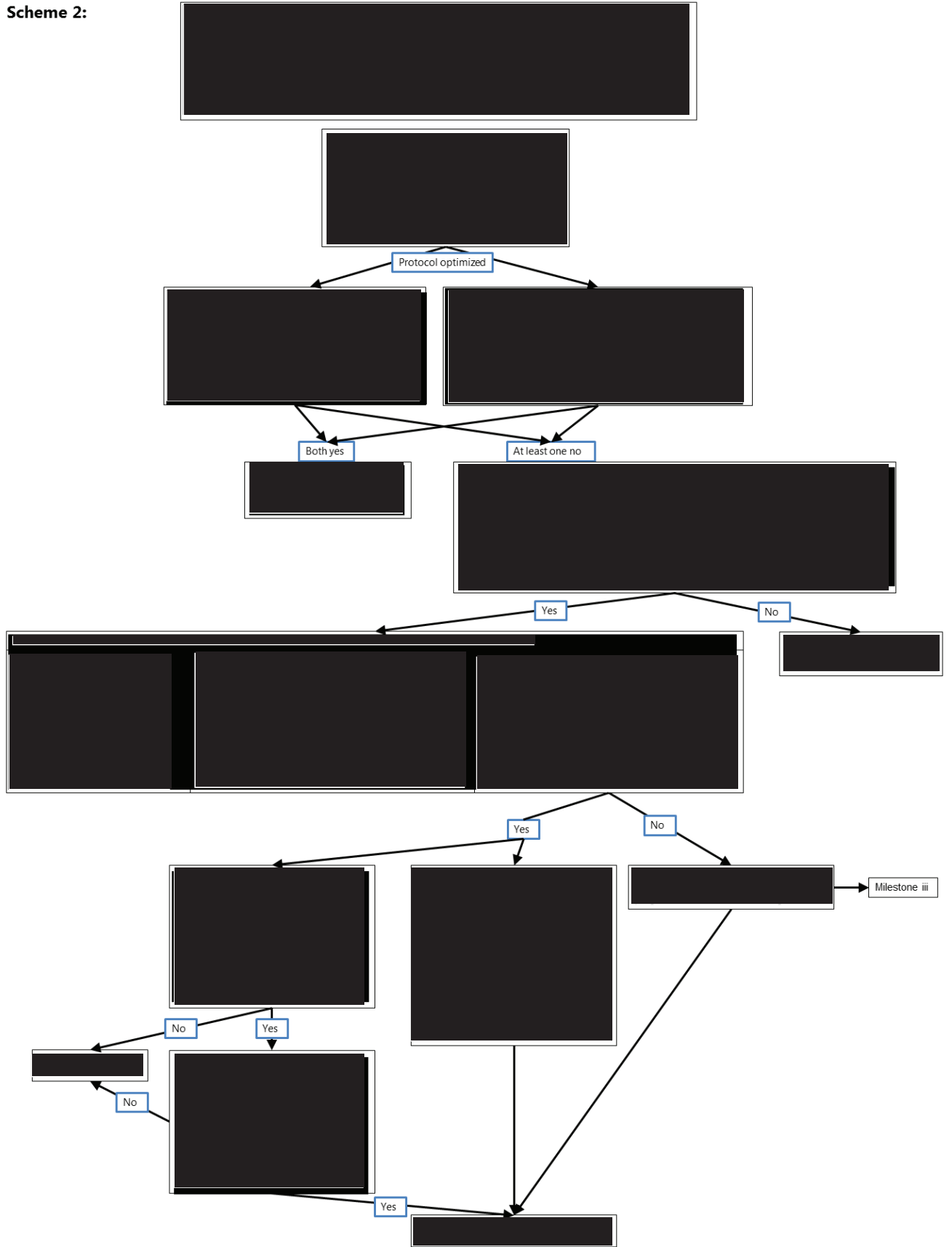
Scheme 1:
Combinations of inflammatory stimuli – interventions – milestones



Ctrl	A	B	C	D	Milestone	Discomfort
√					i-xi	Mild/Mod
	√				i-xi	Mild/Mod
		√			ii-xi	Mild/Mod
			√		iii-vi, viii	Moderate
				√	ix	Moderate
	√	√			ii-xi	Moderate
	√		√		iii-vi, viii, ix	Moderate
		√	√		iii-vi, viii	Moderate
	√	√	√		iii-vi, viii	Moderate
	√			√	ix	Moderate
		√		√	ix	Moderate
	√	√		√	ix	Moderate
			√	√	ix	Moderate

For more technical details on the procedures, we refer to the appendices. To further clarify how typical experiments within this project would be performed, we have chosen to elaborate on the approach of milestone ix in detail. In Scheme 2 we listed the experiments that will be performed to reach this milestone.

Scheme 2:



References

1. Maskrey, B. H., Megson, I. L., Whitfield, P. D. & Rossi, A. G. Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1001-1006 (2011).
2. Moses, K. & Brandau, S. Human neutrophils: Their role in cancer and relation to myeloid-derived suppressor cells. *Semin. Immunol.* **28**, 187-196 (2016).
3. Kaplan, M. J. Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Res. Ther.* **15**, 219 (2013).
4. Bruijnzeel, P. L., Uddin, M. & Koenderman, L. Targeting neutrophilic inflammation in severe neutrophilic asthma: can we target the disease-relevant neutrophil phenotype? *J. Leukoc. Biol.* **98**, 549-556 (2015).
5. Pillay, J., Tak, T., Kamp, V. M. & Koenderman, L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell Mol. Life Sci.* **70**, 3813-3827 (2013).
6. Uribe-Querol, E. & Rosales, C. Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *J. Immunol. Res.* **2015**, 983698 (2015).
7. Hasenberg, A. et al. Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nat. Methods* **12**, 445-452 (2015).
8. Peters, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* **321**, 970-974 (2008).
9. Beerling, E., Ritsma, L., Vrisekoop, N., Derksen, P. W. & van Rheenen, J. Intravital microscopy: new insights into metastasis of tumors. *J. Cell. Sci.* **124**, 299-310 (2011).
10. Ritsma, L., Vrisekoop, N. & van Rheenen, J. In vivo imaging and histochemistry are combined in the cryosection labelling and intravital microscopy technique. *Nat. Commun.* **4**, 2366 (2013).
11. Torabi-Parizi, P. et al. Pathogen-related differences in the abundance of presented antigen are reflected in CD4+ T cell dynamic behavior and effector function in the lung. *J. Immunol.* **192**, 1651-1660 (2014).
12. van Golen, R. F. et al. The mechanisms and physiological relevance of glycocalyx degradation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 1098-1118 (2014).
13. Ritsma, L. et al. Intravital microscopy through an abdominal imaging window reveals a pre-micrometastasis stage during liver metastasis. *Sci. Transl. Med.* **4**, 158ra145 (2012).
14. Zomer, A. et al. Intravital imaging of cancer stem cell plasticity in mammary tumors. *Stem Cells* **31**, 602-606 (2013).
15. Beerling, E. et al. Plasticity between Epithelial and Mesenchymal States Unlinks EMT from Metastasis-Enhancing Stem Cell Capacity. *Cell. Rep.* **14**, 2281-2288 (2016).
16. Gibson, G. J., Loddenkemper, R., Lundback, B. & Sibille, Y. Respiratory health and disease in Europe: the new European Lung White Book. *Eur. Respir. J.* **42**, 559-563 (2013).
17. Pillay, J. et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.* **122**, 327-336 (2012).

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	Intervention A: Compound administration
2	Intervention B: Adoptive transfer
3	Intervention C: Bone marrow scaffold
4	Intervention D: Splenectomy
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'.	11500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Compound administration

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.

The objective of this project is to gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and function of neutrophils in diverse inflammatory conditions. To achieve this, we need to administer compounds to

- Visualize our cells of interest
- Measure cell death, proliferation and lifespan
- Inhibit, stimulate, deplete or mimic components of the inflammatory reaction

The readout of each animal experiment will consist of some or all of the following:

- descriptive data on single cell level (flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.)
- functional data (on specific functions of the neutrophil such as migration, phagocytosis, etc)
- intravital microscopy data
- descriptive data on disease progression (e.g. weight loss, microbial load, tumor size).

The methods for obtaining these readout parameters will be the same for all experiments, but the inflammatory stimulus will differ per experiment. The purpose of our experiments is to compare the neutrophil populations between all the different inflammatory conditions.

Ex vivo analysis:

In order to study the origin and kinetics of the neutrophil populations we need to investigate the different relevant organs. Neutrophils develop in the bone marrow and occasionally the spleen and subsequently migrate through the blood to the inflammatory site. In addition, neutrophils are thought to reside in the lungs and liver (marginated pool). All these organs are therefore relevant for our studies. Whenever we will perform animal experiments we will therefore harvest multiple organs for our analysis.

After the different interventions, tissues can be isolated and analyzed with microscopy. In addition cells can be isolated from the different tissues for further descriptive analysis (e.g. FACS of cell surface

expression) and/or for functional assays (e.g. survival assay, bacterial killing capacity, T cell suppression capacity).

This *ex vivo* analysis will allow us to link surface markers between human and mouse neutrophils. Surface marker expression and nuclear morphology allow us to distinguish different neutrophil subsets in mice, in multiple organs. We can see whether the different inflammatory conditions recruit the subsets with similar dynamics. Lastly, using functional *in vitro* assays we can investigate whether the subsets differ in their capacity e.g. to kill microbes and suppress T cell proliferation like we found in humans.

Intravital imaging:

Two different strategies will be used for the imaging experiments: (1) Imaging in an acute experiment under anesthesia and (2) implanting an imaging window (such as on the breast, skin, abdomen and skull) and repeatedly image through that window. For long-term studies the animal needs to be imaged by multiple imaging sessions, and therefore imaging windows are required. From experience we know that the implantation of intracutaneous windows does not lead to post-operative discomfort.

For some research questions, the tissue needs to be visualized frequently for a relative short-period of time (up to max 2 days). It is ethically undesirable to anesthetize the animal multiple times a day, so the animal will be constantly anesthetized. We have a lot of experience in the lab with these procedures, and only well trained researchers will perform these experiments. We have observed homeostatic neutrophils respond normally to stimuli under the conditions of these experiments.

In vivo imaging will allow us to study dynamic processes that are missed in static analysis. Imaging windows allow us to image the same mouse repeatedly over time as opposed to analyzing separate mice at different timepoints, greatly reducing the amount of animals needed. Additionally, this provides paired data, introducing less variation and therefore fewer animals are needed to get statistically significant results.

At the end point of intravital microscopy, tissues will always be analyzed *ex vivo* to reduce the number of mice required.

Procedures: A detailed description of the window surgery, including postoperative assessment of behavior (largely normal scores) and weight (slight decreases 1 day post surgery) is published by Ritsma et al in *Sci Transl Med* 2012 and *Nature Protocols* 2013.^{14, 15} These publications also describe subsequent intermittent intravital imaging. In short, mice will be anesthetized, positioned on a heat pad for proper temperature control and shaved. An incision is made in the skin for the intracutaneous window, while for the abdominal imaging window an incision is made in both skin and peritoneum. The incision is then sutured using a purse-string suture through both layers around the edges, creating four loops and leaving the suture untightened. Next, the window is placed within the incision. Different organs require different fixation techniques.¹⁵ Ultimately, the skin (and peritoneum) are placed in the window groove, and the suture is tightened to fix the window.

For subsequent intravital imaging the mice will also be anesthetized and placed in a custom made imaging box. The microscope is covered by a climate chamber allowing proper temperature control. Saline will be administered subcutaneously (under anesthesia) for imaging sessions of more than an hour.

Symptoms: Mice can experience post-operative pain demonstrated by changed behavior as described in section J. Within 1 day post surgery the majority of animals are found to behave normally. Intravital imaging sessions do not lead to noticeable symptoms.

Level of discomfort: moderate during surgery, mild thereafter for intracutaneous windows, moderate thereafter for abdominal and skull windows.

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

Below the experimental approach per inflammatory stimulus and the intervention will be described. The choices about mice strains and numbers are further explained in B.

1. Inflammatory stimulus: LPS injection

Justification: LPS is a relatively simple model for acute inflammation with which we have a lot of experience in vivo in humans. It is in this model where we first described the different neutrophil subsets.

Description: Mice receive a single bolus of *E. coli* lipopolysaccharide intravenously (i.v.).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours-days

Procedures: Mice receive a single bolus of *E. coli* lipopolysaccharide intravenously (i.v.) in the tail vein (no anesthesia) or retro-orbitally (while under anesthesia).

Symptoms: Mice are expected to have transient (< 1 day) symptoms associated with an acute inflammatory response such as hypothermia, weight loss and behavioral changes as described in section J.

Level of discomfort: mild or moderate

2. Inflammatory stimulus: Bacterial infection

Justification: Bacterial infection is a more complex, but more physiological relevant model for acute inflammation with which we have a lot of experience *in vitro* in humans.

Description: Mice are infected with (fluorescent) staphylococci via intradermal, i.v. or intraperitoneal injection as described before^{1, 2}.

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – 2 weeks

Procedures: Intraperitoneal and i.v. vein injections will be performed without anesthesia, whereas intradermal or retro-orbital injections will be performed under anesthesia.

Symptoms: Intradermal injections of bacteria are well tolerated and do not lead to noticeable symptoms. Intraperitoneal or i.v. injection can lead to symptoms associated with an acute inflammatory response such as hypothermia, weight loss and behavioral changes as described in section J.

Level of discomfort: moderate

3. Inflammatory stimulus: Viral infection

Justification: Viral infection is a complex physiological relevant model for inflammation with which we have some experience *in vitro* in humans.

Description: Mice are infected with influenza virus or rhinovirus 16 via intranasal administration, as performed before (Suzanne Bal, personal communication).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – 8 weeks

Procedures: Mice will be lightly anesthetized and drops of saline containing virus will be delivered intranasally.

Symptoms: Viral infection can lead to symptoms associated with an acute inflammatory response such as hypothermia, weight loss and behavioral changes as described in section J.

Level of discomfort: moderate

4. Inflammatory stimulus: Plastic particles

Justification: The effects of microplastics on human health are currently understudied. We have found neutrophils can engulf microplastics and now want to investigate their effect on neutrophil survival and function.

Description: Microplastics (plastic particles $\leq 1 \mu\text{m}$) are administered via subcutaneous/intradermal injection, via addition to the drinking water, or via i.v. injection to mimic exposure routes in humans.

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – one year

Procedures: i.v. vein injections will be performed without anesthesia, whereas subcutaneous/intradermal or retro-orbital injections will be performed under anesthesia. Microplastics will also be added to the drinking water.

Symptoms: Intradermal injections of microplastics are well tolerated and do not lead to noticeable symptoms. The effects of i.v. microplastics injection and administration in the drinking water have not been described before, but as these are inert materials they are not expected to cause symptoms. However, weight loss and behavioral changes as described in section J will be tightly monitored.

Level of discomfort: mild or moderate

5. Inflammatory stimulus: Sterile injury

Justification: Sterile injury is known to recruit neutrophils without a pathogenic stimulus. Therefore this can act as a control for pathogen infection or as a model for damage-associated molecular pattern (DAMP) release.

Description: Under anesthesia, sterile injury is inflicted in the skin by needle insertion or laser damage

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours - days

Procedures: The mice will be anesthetized and a sterile damage will be inflicted either by insertion of a sterile needle or by laser damage inflicted by the 2-photon microscope with a setting of much higher laser power and zoom than is used for imaging.

Symptoms: These local inflammations are well tolerated and do not lead to noticeable symptoms. However, behavioral changes as described in section J will be tightly monitored.

Level of discomfort: mild or moderate

6. Inflammatory stimulus: Airway allergy

Justification: Allergy is a complex physiological relevant model for chronic inflammation with which we have a lot of experience in humans.

Description: Mice are sensitized and challenged with house dust mite by intranasal administration, as performed before (Suzanne Bal, personal communication).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: 2 – 8 weeks

Procedures: Mice will be lightly anesthetized and drops of saline containing allergens (eg house dust mite) will be delivered intranasally 5 days a week for 5 consecutive weeks.

Symptoms: Allergen administration is generally well tolerated and does not lead to noticeable symptoms. However, repetitive anesthesia will cause some discomfort. Behavioral changes as described in section J will be tightly monitored.

Level of discomfort: mild or moderate

7. Inflammatory stimulus: Solid tumor growth

Justification: Cancer is a complex physiological relevant model for chronic inflammation. The suppressive neutrophil has been described in this model.

Description: We use genetic mouse models for breast or colorectal cancer, or transfer tumor cells/pieces from these mouse models to healthy mice of the same background to increase reproducibility or for intravital imaging.

Mice: Spontaneous tumor models or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – months

Procedures: Genetic mouse models will spontaneously develop tumors or will require i.p. tamoxifen administration for tumor initiation. I.p. injections will not be performed under anesthesia. Tumor cells can be injected or tumor pieces can be positioned at different locations (e.g. mammary gland, liver, intestine, brain, mesenteric vein) under anesthesia.

Symptoms: Mice can experience post-operative pain for 1 day after surgery. Small tumors are generally well tolerated and do not lead to noticeable symptoms. Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. For all tumor models the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed, taking into account e.g. the size, location and ulceration of the tumor(s). Behavioral changes as described in section J will be tightly monitored.

Level of discomfort: mild or moderate

These different inflammatory stimuli will be combined with the intervention described here and/or with interventions B/C/D, as described in the project proposal.

Intervention A: Administration of drugs/antibodies/inhibitors/labels

Description: Drugs, antibodies, small molecules, chemicals, fluorescent compounds, propidium iodide to monitor cell death, Hoechst to stain nuclei, or compounds which incorporate into DNA to measure cell life span and proliferation such as deuterated water, deuterated glucose, EdU, or BrdU are administered to mice via the appropriate route as described in literature (i.v., i.p., i.n., diet, etc).

Rationale:

- During intravital imaging different cells and structures should be distinguished. E.g. CD62L is a surface receptor that can distinguish different neutrophil subsets. By staining CD62L using a fluorescent antibody we can visualize these different subsets *in vivo* to help achieve milestones i-iv, vi, viii and ix.
- Measure cell life span and proliferation E.g. by deuterium incorporation into DNA of proliferating cells we can determine the lifespan of neutrophils in homeostasis vs inflammatory conditions as described in milestone iii, vii and ix.
- Inhibit, stimulate, deplete or mimic components of the inflammatory reaction. E.g. by deleting neutrophils with anti-Ly6G antibodies we can delineate the role neutrophils play in disease progression or behavior of other cell types to accomplish milestone x and xi. The specific nature of these compounds will follow from our experimental results in the next five years.

Extra experimental groups: treated vs. not treated.

Number of mice per group: as described per inflammatory stimulus.

Duration of intervention: seconds – months, possibly repeatedly

Level of discomfort: mild or moderate

The final level of discomfort depends on the inflammatory stimulus, whether the intervention is used in combination with other interventions and the choice of the readout parameter. Harvesting of organs for *ex vivo* analysis or single session intravital imaging will result only in mild discomfort, but repeated intravital imaging will probably result in moderate discomfort.

The experimental design and the exact number of animals of each experiment is determined and described in detail in a work protocol according to the advice from the Animal Welfare Body and a statistician.

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

When possible, blinding and randomization will be used to prevent bias as much as possible. For example, videos obtained with intravital imaging can be coded by an independent colleague before image analysis by the researcher.

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$. Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based on literature and/or years of experience with similar type of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

B. The animals

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

Since for our experiments the different interventions described in the different appendices will be combined, it is difficult to pinpoint the estimated numbers per intervention. Therefore here we describe the grand total of estimated numbers for our whole project.

Species: *Mus musculus*

Origin: Common breeding facility (Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium) at Utrecht University/Hubrecht institute/external licensed breeders

Estimated numbers: max. 2850

Life stages: adults

Species

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand neutrophil development, homeostasis and response to inflammation in the context of the whole organism. For the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) physiology is more extensively characterized than other animal models; (2) a large number of relevant transgenic and knock out lines is already available; (3) a large number of relevant antibodies and other compounds is already available; (4) our research shows murine neutrophils are representative for human neutrophils; (5) many procedures for intravital imaging have already been described. The zebrafish is also an animal widely used for intravital imaging, but the differentiation of zebrafish neutrophils is much less similar to human neutrophils. Since mice are mammals too, they are closer to the human.

Mice strains used are amongst others:

- Wildtype BL/6
- Wildtype Balb/c
- Wildtype FVB
- LysM-GFP mice; for visualization of fluorescent neutrophils in intravital imaging. We are already working with this strain.
- Catchup^{IVM} mice (Ly6G-Cre + Rosa-Td-Tomato); for visualization of fluorescent neutrophils in intravital imaging and for conditional knockouts in neutrophils⁵. This strain was very recently created, we want to import this strain. If the results will be superior to LysM-GFP mice, we will switch to this strain.
- MRP/S100A8-Tg-EGFP-Cre; for conditional knockouts in neutrophil progenitors⁶. We want to import this strain. As opposed to the Catchup^{IVM} mice, Cre recombinase is expressed in

- granulocyte-macrophage progenitors in the bone marrow.
- Knockout mice (e.g. CD11b-knockout mice); to investigate the role of a specific gene or protein
- Tumor models such as MMTV-PyMT, MMTV-Wnt1 or C26 colorectal cancer mice. In our currently running animal experiments we are comparing different tumor models with each other, to optimize for future experiments. Therefore we have not completely decided which tumor models we will use in the next five years, but it will be a model that is similar in execution and discomfort as the here mentioned examples.
- Humanized mice⁷ or immunocompromised mice (e.g. NSG mice); to investigate the behavior of human neutrophils in an *in vivo*-like situation.

If the required genetically modified mouse is not available, we will obtain this model by generating, importing or by crossing existing models. Other strains will be used when in the next five years, novel strains are described or created that are very relevant to our hypotheses.

Estimated numbers

Our experiments can be divided into:

- Descriptive analysis (5-15 animals x max 5 time points = max 75 animals)
- Functional assays (5-15 animals x max 5 time points = max 75 animals)
- Intravital imaging (5-10 animals)

This totals to 55-160 animals

However, we have 7 inflammatory stimuli, 4 interventions and no intervention per stimuli = 35 conditions.

So for the total we have to multiply the 55-160 animals with 35 = 1925-5600 animals

However, these numbers are overestimations because:

- Controls can be shared between experiments when these are performed simultaneously
- Descriptive single cell and functional assays will be combined when neutrophil numbers allow this
- When differences between groups turn out to be very striking, we do not need the maximum number of mice per group
- Successful pilot studies may be included in the dataset

Therefore we do not anticipate we will need more than 2500 mice for the experiments.

Additionally, a number of ca. **350** mice is needed for:

	Estimated nr
Maintenance of breeding	100
Pilot studies for validation of models/techniques#	50
Training of new personnel or new techniques	50
Rederivation of imported strains via embryo transfer	100
To compensate for unforeseen loss of animals*	50

*(max 10%, e.g. due to location not suitable for imaging, problems with the window)

#Only procedures mentioned in this project proposal

Mice that become surplus during breeding, will be used for pilot studies and training purposes.

Together we therefore anticipate we need a grand total of **2850** mice.

Sex

In general, we will try to use both male and female mice. However, it is clear that the immune response of males and females can greatly differ⁸. Therefore, we will perform pilot studies to ensure that the sex of the animal does not pose a bias in answering the particular research question. These pilots may prove it necessary to use only one sex within one animal experiment, to be able to reliably compare experimental groups.

One clear exception is the MMTV-PyMT breast cancer model; in this model only female mice consistently develop breast tumors.

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:

Immune responses are highly complex and multifaceted. Multiple compartments such as the bone marrow, spleen, endothelial wall and inflamed tissue interact. Certain aspects of the immune response can be separately simulated *in vitro*, but it is not yet possible to study the full course of infection and the elicited immune response *in vitro*. This requires animal models. Similarly, the use of experimental interventions to test their potential beneficial impact on the course of disease can only be assessed in animal models. Clearly, such experimental interventions cannot be performed in patients, while *in vitro* studies with isolated human cells do not capture the full complexity of infection. However, before turning to mice, we will first study human cells *in vitro* to ensure we only perform the most relevant experiments in mice.

Reduction:

Intravital imaging using imaging windows allows us to image the same mouse repeatedly over time as opposed to analyzing separate mice at different timepoints greatly reducing the amount of animals needed. Additionally, this provides paired data, introducing less variation and therefore fewer animals are needed to get statistical significant results. Statistical power calculation based on our own previous experience and literature will be used to determine the optimal number of mice for each experimental group. Moreover, experiments will be performed sequentially, based on the described go/no-go decisions, via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative. Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible.

Refinement:

Except for mice with windows, where co-housing can give problems, mice will be housed in groups in cages. Nesting opportunities will always be provided. Mice with windows will be monitored at least twice a week, mice after bacterial or viral infection will be monitored at least every other day, more if necessary, for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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

As described under refinement, mice welfare will be regularly monitored. Mice reaching the humane endpoints or otherwise suffering from severe discomfort will be euthanized. New personnel will be trained to recognize discomfort in mice according to current guidelines (e.g. ⁹). Surgical exposure will be performed under aseptic conditions using sterile instruments. Heating devices will be used to ensure a stable body temperature of the mouse during anaesthesia. Personnel conducting the surgeries is first properly trained, starting with training on cadavers.

Surgical exposure will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Pre- and post-procedural analgesia will be used when indicated or when pain-related behavior is observed. However, common analgesics such as opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to significantly alter the immune response¹⁰⁻¹². Since this is our main research topic, we might sometimes refrain from using analgesia. It may be necessary to do pilot studies to prove whether analgesics pose a bias in answering our particular research question. From literature, it seems buprenorphine may be a reasonable candidate¹³.

There are no expected adverse effects on the environment.

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.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

Mice with an imaging window will be housed individually to prevent other mice from biting or damaging the window.

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Surgical exposure will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Pre- and post-procedural analgesia will be used when indicated or when pain-related behavior is observed. However, common analgesics such as opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to significantly alter the immune response¹⁰⁻¹². Since this is our main research topic, we might sometimes refrain from using analgesia. However, pain can also influence the immune system. Therefore, it may be necessary to do pilot studies to prove whether analgesics pose a bias in answering our particular research question.

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

Surgical exposure will be performed under aseptic conditions using sterile instruments. Heating devices will be used to ensure a stable body temperature of the mouse during anaesthesia. Personnel conducting the surgeries is first properly trained, starting with training on cadavers. Before, during and after surgery adequate anesthesia and analgesia (e.g. isoflurane and buprenorphine) will be used, according to experience as well as published protocols. New personnel will be trained to recognize discomfort in mice according to current guidelines (e.g. ⁹).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will consist of a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than moderate discomfort. Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. All relevant scientific data can and will be gathered *before* the cancer, infection or allergy studies reach a level of severe discomfort. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

It is expected that no animals (0%) will be experiencing more than mild discomfort due to the genetic modification. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect.

So, in all cases, animals will be carefully monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day and analyzed when possible. Animals may lose their window (<5%). In the vast majority of these animals (>95%), we notice signs of detachment of the window far before it becomes loose, and the mice will be sacrificed. In the remaining animals, the window loss will be noticed within 24hrs and the mouse will be immediately sacrificed.

Explain why these effects may emerge.

Tumor development, inflicted inflammation, genetic alterations and administration of compounds/ drugs/ chemicals/ toxins.

It is unclear why some animals may lose their windows.

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

Mice with windows will be monitored at least twice a week, mice after bacterial or viral infection will be monitored at least every other day, more if necessary, for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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.

As described in D, F, H and I, the experiments will be set-up in such a way that the incidence of reaching the humane end-point is kept to a minimum.

Weight loss (>20% in comparison with control or original weight or 15% weight loss in two days), reaching a score of 4 on the illness scale (specified below), severe shortness of breath, or loss of window is set as an humane end point. For all tumor models the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed, taking into account e.g. the size, location and ulceration of the tumor(s).

Next to model-specific parameters, an illness grading scale will always be used to score a set of clinical features detected in mice with different degrees of illness:

0: healthy

1: barely ruffled fur

2: ruffled fur, but active

3: ruffled fur and inactive

4: ruffled fur, inactive, hunched, and gaunt

5: dead

Indicate the likely incidence.

Expected <5% and <1day.

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative level of discomfort is dependent on the intervention, the read-out and the animal model. The discomfort of these three range from mild to moderate. Therefore combinations of these result in moderate discomfort for the majority (~90%) of animals.

References for the whole appendix

1. Liese, J., Rooijackers, S. H., van Strijp, J. A., Novick, R. P. & Dustin, M. L. Intravital two-photon microscopy of host-pathogen interactions in a mouse model of Staphylococcus aureus skin abscess formation. *Cell. Microbiol.* **15**, 891-909 (2013).
2. Spaan, A. N. *et al.* The staphylococcal toxins gamma-haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nat. Commun.* **5**, 5438 (2014).
3. Groen, R. W. *et al.* Reconstructing the human hematopoietic niche in immunodeficient mice: opportunities for studying primary multiple myeloma. *Blood* **120**, e9-e16 (2012).
4. Levy, L. *et al.* Splenectomy inhibits non-small cell lung cancer growth by modulating anti-tumor adaptive and innate immune response. *Oncoimmunology* **4**, e998469 (2015).
5. Hasenberg, A. *et al.* Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nat. Methods* **12**, 445-452 (2015).
6. Lagasse, E. & Weissman, I. L. Bcl-2 Inhibits Apoptosis of Neutrophils but Not their Engulfment by Macrophages. *J. Exp. Med.* **179**, 1047-1052 (1994).

7. Coughlan, A. M., Freeley, S. J. & Robson, M. G. Animal models of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **169**, 229-237 (2012).
8. Gubbels Bupp, M. R. Sex, the aging immune system, and chronic disease. *Cell. Immunol.* **294**, 102-110 (2015).
9. Burkholder, T., Foltz, C., Karlsson, E., Linton, C. G. & Smith, J. M. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **2**, 145-165 (2012).
10. Salimi, V. *et al.* Opioid receptors control viral replication in the airways. *Crit. Care Med.* **41**, 205-214 (2013).
11. Sacerdote, P. Opioids and the immune system. *Palliat. Med.* **20 Suppl 1**, s9-15 (2006).
12. Hish, G. A., Diaz, J. A., Hawley, A. E., Myers, D. D. & Lester, P. A. Effects of Analgesic Use on Inflammation and Hematology in a Murine Model of Venous Thrombosis. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **53**, 485-493 (2014).
13. Mundt, S., Groettrup, M. & Basler, M. Analgesia in mice with experimental meningitis reduces pain without altering immune parameters. *ALTEX* **32**, 183-189 (2015).
14. Ritsma L, Steller EJA, Beerling E, et al. (2012) Intravital Microscopy Through an Abdominal Imaging Window Reveals a Pre-Micrometastasis Stage During Liver Metastasis. *Sci Transl Med* 4:158ra145–158ra145.
15. Ritsma L, Steller EJ a, Ellenbroek SIJ, et al. (2013) Surgical implantation of an abdominal imaging window for intravital microscopy. *Nat Protoc* 8:583–94. doi: 10.1038/nprot.2013.026

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.

In order to obtain organs and isolated cells for *ex vivo* analysis the mice must first be 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'.	11500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		2	Adoptive transfer

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.

The objective of this project is to gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and function of neutrophils in diverse inflammatory conditions. To achieve this we need to adoptively transfer cells to:

- Visualize the migratory behavior of neutrophils and different neutrophil subsets
- Investigate whether [redacted] can [redacted] or rather that [redacted]
- Determine whether different neutrophil subsets have different functions (including bacterial killing and the inhibition of immune responses)

The readout of each animal experiment will consist of some or all of the following:

- descriptive data on single cell level (flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.)
- functional data (on specific functions of the neutrophil such as migration, phagocytosis, etc)
- intravital microscopy data
- descriptive data on disease progression (e.g. weight loss, microbial load, tumor size).

The methods for obtaining these readout parameters will be the same for all experiments in this proposal, but the inflammatory stimulus will differ per experiment. The purpose of our experiments is to compare the neutrophil populations between all the different inflammatory conditions.

Ex vivo analysis:

In order to study the origin and kinetics of the neutrophil populations we need to investigate the different relevant organs. Neutrophils develop in the bone marrow and occasionally the spleen and subsequently migrate through the blood to the inflammatory site. In addition, neutrophils are thought to reside in the lungs and liver (marginated pool). All these organs are therefore relevant for our studies. Whenever we will perform animal experiments we will therefore harvest multiple organs for our analysis.

After the different interventions, tissues can be isolated and analyzed with microscopy. In addition cells can be isolated from the different tissues for further descriptive analysis (e.g. FACS of cell surface expression) and/or for functional assays (e.g. survival assay, bacterial killing capacity, T cell suppression capacity).

This *ex vivo* analysis will allow us to link surface markers between human and mouse neutrophils. Surface marker expression and nuclear morphology allow us to distinguish different neutrophil subsets in mice, in multiple organs. We can see whether the different inflammatory conditions recruit the subsets with similar dynamics. Lastly, using functional *in vitro* assays we can investigate whether the subsets differ in their capacity e.g. to kill microbes and suppress T cell proliferation like we found in humans.

Intravital imaging:

Two different strategies will be used for the imaging experiments: (1) Imaging in an acute experiment under anesthesia and (2) implanting an imaging window (such as on the breast, skin, abdomen and skull) and repeatedly image through that window. For long-term studies the animal needs to be imaged by multiple imaging sessions, and therefore imaging windows are required. From experience we know that the implantation of intracutaneous windows does not lead to post-operative discomfort.

For some research questions, the tissue needs to be visualized frequently for a relative short-period of time (up to max 2 days). It is ethically undesirable to anesthetize the animal multiple times a day, so the animal will be constantly anesthetized. We have a lot of experience in the lab with these procedures, and only well trained researchers will perform these experiments. We have observed homeostatic neutrophils respond normally to stimuli under the conditions of these experiments.

In vivo imaging will allow us to study dynamic processes that are missed in static analysis. Imaging windows allow us to image the same mouse repeatedly over time as opposed to analyzing separate mice at different timepoints, greatly reducing the amount of animals needed. Additionally, this provides paired data, introducing less variation and therefore fewer animals are needed to get statistically significant results.

At the end point of intravital microscopy, tissues will always be analyzed *ex vivo* to reduce the number of mice required.

Procedures: A detailed description of the window surgery, including postoperative assessment of behavior (largely normal scores) and weight (slight decreases 1 day post surgery) is published by Ritsma et al in *Sci Transl Med* 2012 and *Nature Protocols* 2013.^{14, 15} These publications also describe subsequent intermittent intravital imaging. In short, mice will be anesthetized, positioned on a heat pad for proper temperature control and shaved. An incision is made in the skin for the intracutaneous window, while for the abdominal imaging window an incision is made in both skin and peritoneum. The incision is then sutured using a purse-string suture through both layers around the edges, creating four loops and leaving the suture untightened. Next, the window is placed within the incision. Different organs require different fixation techniques.¹⁵ Ultimately, the skin (and peritoneum) are placed in the window groove, and the suture is tightened to fix the window.

For subsequent intravital imaging the mice will also be anesthetized and placed in a custom made imaging box. The microscope is covered by a climate chamber allowing proper temperature control. Saline will be administered subcutaneously (under anesthesia) for imaging sessions of more than an hour.

Symptoms: Mice can experience post-operative pain demonstrated by changed behavior as described in section J. Within 1 day post surgery the majority of animals are found to behave normally. Intravital imaging sessions do not lead to noticeable symptoms.

Level of discomfort: moderate during surgery, mild thereafter for intracutaneous windows, moderate thereafter for abdominal and skull windows.

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

The objective of this project is to gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and function of neutrophils in diverse inflammatory conditions. Below the experimental approach per inflammatory stimulus and the intervention will be described. The choices about mice strains and numbers are further explained in B.

1. Inflammatory stimulus: LPS injection

Justification: LPS is a relatively simple model for acute inflammation with which we have a lot of experience *in vivo* in humans. It is in this model where we first described the different neutrophil subsets.

Description: Mice receive a single bolus of E. coli lipopolysaccharide intravenously (i.v.).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours-days

Procedures: Mice receive a single bolus of E. coli lipopolysaccharide intravenously (i.v.) in the tail vein (no anesthesia) or retro-orbitally (while under anesthesia).

Symptoms: Mice are expected to have transient (< 1 day) symptoms associated with an acute inflammatory response such as hypothermia, weight loss and behavioral changes as described in section J.

Level of discomfort: mild or moderate

2. Inflammatory stimulus: Bacterial infection

Justification: Bacterial infection is a more complex, but more physiological relevant model for acute inflammation with which we have a lot of experience *in vitro* in humans.

Description: Mice are infected with (fluorescent) staphylococci via intradermal or intraperitoneal injection as described before^{1, 2}.

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – 2 weeks

Procedures: Intraperitoneal and i.v. vein injections will be performed without anesthesia, whereas intradermal or retro-orbital injections will be performed under anesthesia.

Symptoms: Intradermal injections of bacteria are well tolerated and do not lead to noticeable symptoms. Intraperitoneal or i.v. injection can lead to symptoms associated with an acute inflammatory response such as hypothermia, weight loss and behavioral changes as described in section J.

Level of discomfort: moderate

3. Inflammatory stimulus: Viral infection

Justification: Viral infection is a complex physiological relevant model for inflammation with which we have some experience *in vitro* in humans.

Description: Mice are infected with influenza virus or rhinovirus 16 via intranasal administration, as performed before (Suzanne Bal, personal communication).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – 8 weeks

Procedures: Mice will be lightly anesthetized and drops of saline containing virus will be delivered intranasally.

Symptoms: Viral infection can lead to symptoms associated with an acute inflammatory response such as

hypothermia, weight loss and behavioral changes as described in section J.

Level of discomfort: moderate

4. Inflammatory stimulus: Plastic particles

Justification: The effects of microplastics on human health are currently understudied. We have found neutrophils can engulf microplastics and now want to investigate their effect on neutrophil survival and function.

Description: Microplastics (plastic particles $\leq 1 \mu\text{m}$) are administered via subcutaneous injection, via addition to the drinking water, or via i.v. injection to mimic exposure routes in humans.

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – one year

Procedures: i.v. vein injections will be performed without anesthesia, whereas subcutaneous/intradermal or retro-orbital injections will be performed under anesthesia. Microplastics will also be added to the drinking water.

Symptoms: Intradermal injections of microplastics are well tolerated and do not lead to noticeable symptoms. The effects of i.v. microplastics injection and administration in the drinking water have not been described before, but as these are inert materials they are not expected to cause symptoms. However, weight loss and behavioral changes as described in section J will be tightly monitored.

Level of discomfort: mild or moderate

5. Inflammatory stimulus: Sterile injury

Justification: Sterile injury is known to recruit neutrophils without a pathogenic stimulus. Therefore this can act as a control for pathogen infection or as a model for damage-associated molecular pattern (DAMP) release.

Description: Under anesthesia, sterile injury is inflicted in the skin by needle insertion or laser damage

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours - days

Procedures: The mice will be anesthetized and a sterile damage will be inflicted either by insertion of a sterile needle or by laser damage inflicted by the 2-photon microscope with a setting of much higher laser power and zoom than is used for imaging.

Symptoms: These local inflammations are well tolerated and do not lead to noticeable symptoms. However, behavioral changes as described in section J will be tightly monitored.

Level of discomfort: mild or moderate

6. Inflammatory stimulus: Airway allergy

Justification: Allergy is a complex physiological relevant model for chronic inflammation with which we have a lot of experience in humans.

Description: Mice are sensitized and challenged with house dust mite by intranasal administration, as performed before (Suzanne Bal, personal communication).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein

expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: 2 – 8 weeks

Procedures: Mice will be lightly anesthetized and drops of saline containing allergens (eg house dust mite) will be delivered intranasally 5 days a week for 5 consecutive weeks.

Symptoms: Allergen administration is generally well tolerated and does not lead to noticeable symptoms. However, repetitive anesthesia will cause some discomfort. Behavioral changes as described in section J will be tightly monitored.

Level of discomfort: mild or moderate

7. Inflammatory stimulus: Solid tumor growth

Justification: Cancer is a complex physiological relevant model for chronic inflammation. The suppressive neutrophil has been described in this model.

Description: We use genetic mouse models for breast or colorectal cancer, or transfer tumor cells/pieces from these mouse models to healthy mice of the same background to increase reproducibility or for intravital imaging.

Mice: Spontaneous tumor models or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – months

Procedures: Genetic mouse models will spontaneously develop tumors or will require i.p. tamoxifen administration for tumor initiation. I.p. injections will not be performed under anesthesia. Tumor cells can be injected or tumor pieces can be positioned at different locations (e.g. mammary gland, liver, intestine, brain, mesenteric vein) under anesthesia.

Symptoms: Mice can experience post-operative pain for 1 day after surgery. Small tumors are generally well tolerated and do not lead to noticeable symptoms. Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. For all tumor models the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed, taking into account e.g. the size, location and ulceration of the tumor(s). Behavioral changes as described in section J will be tightly monitored.

Level of discomfort: mild or moderate

These different inflammatory stimuli will be combined with the intervention described here and/or with interventions A/C/D, as described in the project proposal.

Intervention B: Adoptive transfer

Description: a single cell suspension of donor cells is administered i.v. to recipient mice.

Rationale: Firstly, (fluorescently) labeled cells will be transferred for tracking migration and function throughout the body. Cells harbouring a specific gene knockout will be transferred to study the role of this gene in specific organs/diseases. Human cells will be transferred to investigate the behavior of human neutrophils in an *in vivo*-like situation.

E.g. different neutrophil subsets might be isolated from a donor mouse and adoptively transferred to a recipient mouse to visualize their difference in functionality to accomplish milestone ii or to follow their distribution to achieve milestone vi.

Extra experimental groups: Donor mice & recipient mice.

Number of mice per group: ratio donor:recipient mostly 1:1, sometimes 2:1 or 3:1

Donor mice: wt mice, intravital imaging strains, knockout strains.

Recipient mice: wt mice, intravital imaging strains, knockout strains, immunodeficient mice. Irradiation of recipient mice to deplete their endogenous immune system might be required.

Duration of intervention: seconds – minutes

Level of discomfort: mild

The final level of discomfort depends on the inflammatory stimulus, whether the intervention is used in combination with other interventions and the choice of the readout parameter. Harvesting of organs for *ex vivo* analysis or single session intravital imaging will result only in mild discomfort, but repeated intravital imaging will probably result in moderate discomfort.

The experimental design and the exact number of animals of each experiment is determined and described in detail in a work protocol according to the advice from the Animal Welfare Body and a statistician.

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

When possible, blinding and randomization will be used to prevent bias as much as possible. For example, videos obtained with intravital imaging can be coded by an independent colleague before image analysis by the researcher.

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$. Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based on literature and/or years of experience with similar type of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

B. The animals

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

Since for our experiments the different interventions described in the different appendices will be combined, it is difficult to pinpoint the estimated numbers per intervention. Therefore here we describe the grand total of estimated numbers for our whole project.

Species: *Mus musculus*

Origin: Common breeding facility (Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium) at Utrecht University/Hubrecht institute/external licensed breeders

Estimated numbers: max. 2850

Life stages: adults

Species

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand neutrophil development, homeostasis and response to inflammation in the context of the whole organism. For the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) physiology is more extensively characterized than other animal models; (2) a large number of relevant transgenic and knock out lines is already available; (3) a large number of relevant antibodies and other compounds is already available; (4) our research shows murine neutrophils are representative for human neutrophils; (5) many procedures for intravital imaging have already been described. The zebrafish is also an animal widely used for intravital imaging, but the differentiation of zebrafish neutrophils is much less similar to human neutrophils. Since mice are mammals too, they are closer to the human.

Mice strains used are amongst others:

- Wildtype BL/6
- Wildtype Balb/c
- Wildtype FVB
- LysM-GFP mice; for visualization of fluorescent neutrophils in intravital imaging. We are already working with this strain.
- Catchup^{IVM} mice (■■■■■ Cre + Rosa-Td-Tomato); for visualization of fluorescent neutrophils in intravital imaging and for conditional knockouts in neutrophils⁵. This strain was very recently created, we want to import this strain. If the results will be superior to LysM-GFP mice, we will switch to this strain.
- MRP/S100A8-Tg-EGFP-Cre; for conditional knockouts in neutrophil progenitors⁶. We want to import this strain. As opposed to the Catchup^{IVM} mice, Cre recombinase is expressed in granulocyte-macrophage progenitors in the bone marrow.

- Knockout mice (e.g. CD11b-knockout mice); to investigate the role of a specific gene or protein
- Tumor models such as MMTV-PyMT, MMTV-Wnt1 or C26 colorectal cancer mice. In our currently running animal experiments we are comparing different tumor models with each other, to optimize for future experiments. Therefore we have not completely decided which tumor models we will use in the next five years, but it will be a model that is similar in execution and discomfort as the here mentioned examples.
- Humanized mice⁷ or immunocompromised mice (e.g. NSG mice); to investigate the behavior of human neutrophils in an *in vivo*-like situation.

If the required genetically modified mouse is not available, we will obtain this model by generating, importing or by crossing existing models. Other strains will be used when in the next five years, novel strains are described or created that are very relevant to our hypotheses.

Estimated numbers

Our experiments can be divided into:

- Descriptive analysis (5-15 animals x max 5 time points = max 75 animals)
- Functional assays (5-15 animals x max 5 time points = max 75 animals)
- Intravital imaging (5-10 animals)

This totals to 55-160 animals

However, we have 7 inflammatory stimuli, 4 interventions and no intervention per stimuli = 35 conditions.

So for the total we have to multiply the 55-160 animals with 35 = 1925-5600 animals

However, these numbers are overestimations because:

- Controls can be shared between experiments when these are performed simultaneously
- Descriptive single cell and functional assays will be combined when neutrophil numbers allow this
- When differences between groups turn out to be very striking, we do not need the maximum number of mice per group
- Successful pilot studies may be included in the dataset

Therefore we do not anticipate we will need more than 2500 mice for the experiments.

Additionally, a number of ca. 350 mice is needed for:

	Estimated nr
Maintenance of breeding	100
Pilot studies for validation of models/techniques#	50
Training of new personnel or new techniques	50
Rederivation of imported strains via embryo transfer	100
To compensate for unforeseen loss of animals*	50

*(max 10%, e.g. due to location not suitable for imaging, problems with the window)

#Only procedures mentioned in this project proposal

Mice that become surplus during breeding, will be used for pilot studies and training purposes.

Together we therefore anticipate we need a grand total of 2850 mice.

Sex

In general, we will try to use both male and female mice. However, it is clear that the immune response of males and females can greatly differ⁸. Therefore, we will perform pilot studies to ensure that the sex of the animal does not pose a bias in answering the particular research question. These pilots may prove it necessary to use only one sex within one animal experiment, to be able to reliably compare experimental groups.

One clear exception is the MMTV-PyMT breast cancer model; in this model only female mice consistently develop breast tumors.

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:

Immune responses are highly complex and multifaceted. Multiple compartments such as the bone marrow, spleen, endothelial wall and inflamed tissue interact. Certain aspects of the immune response can be separately simulated *in vitro*, but it is not yet possible to study the full course of infection and the elicited immune response *in vitro*. This requires animal models. Similarly, the use of experimental interventions to test their potential beneficial impact on the course of disease can only be assessed in animal models. Clearly, such experimental interventions cannot be performed in patients, while *in vitro* studies with isolated human cells do not capture the full complexity of infection. However, before turning to mice, we will first study human cells *in vitro* to ensure we only perform the most relevant experiments in mice.

Reduction:

Intravital imaging using imaging windows allows us to image the same mouse repeatedly over time as opposed to analyzing separate mice at different timepoints greatly reducing the amount of animals needed. Additionally, this provides paired data, introducing less variation and therefore fewer animals are needed to get statistical significant results. Statistical power calculation based on our own previous experience and literature will be used to determine the optimal number of mice for each experimental group. Moreover, experiments will be performed sequentially, based on the described go/no-go decisions, via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative. Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible.

Refinement:

Except for mice with windows, where co-housing can give problems, mice will be housed in groups in cages. Nesting opportunities will always be provided. Mice with windows will be monitored at least twice a week, mice after bacterial or viral infection will be monitored at least every other day, more if necessary, for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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

As described under refinement, mice welfare will be regularly monitored. Mice reaching the humane endpoints or otherwise suffering from severe discomfort will be euthanized. New personnel will be trained to recognize discomfort in mice according to current guidelines (e.g. ⁹). Surgical exposure will be performed under aseptic conditions using sterile instruments. Heating devices will be used to ensure a stable body temperature of the mouse during anaesthesia. Personnel conducting the surgeries is first properly trained, starting with training on cadavers.

Surgical exposure will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Pre- and post-procedural analgesia will be used when indicated or when pain-related behavior is observed. However, common analgesics such as opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to significantly alter the immune response¹⁰⁻¹². Since this is our main research topic, we might sometimes refrain from using analgesia. It may be necessary to do pilot studies to prove whether analgesics pose a bias in answering our particular research question. From literature, it seems buprenorphine may be a reasonable candidate¹³.

There are no expected adverse effects on the environment.

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.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

Mice with an imaging window will be housed individually to prevent other mice from biting or damaging the window.

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Surgical exposure will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Pre- and post-procedural analgesia will be used when indicated or when pain-related behavior is observed. However, common analgesics such as opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to significantly alter the immune response¹⁰⁻¹². Since this is our main research topic, we might sometimes refrain from using analgesia. However, pain can also influence the immune system. Therefore, it may be necessary to do pilot studies to prove whether analgesics pose a bias in answering our particular research question.

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

Surgical exposure will be performed under aseptic conditions using sterile instruments. Heating devices will be used to ensure a stable body temperature of the mouse during anaesthesia. Personnel conducting the surgeries is first properly trained, starting with training on cadavers. Before, during and after surgery adequate anesthesia and analgesia (e.g. isoflurane and buprenorphine) will be used, according to experience as well as published protocols. New personnel will be trained to recognize discomfort in mice according to current guidelines (e.g. ⁹).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will consist of a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than moderate discomfort. Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. All relevant scientific data can and will be gathered *before* the cancer, infection or allergy studies reach a level of severe discomfort. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized. It is expected that no animals (0%) will be experiencing more than mild discomfort due to the genetic modification. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect.

So, in all cases, animals will be carefully monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day and analyzed when possible. Animals may lose their window (<5%). In the vast majority of these animals (>95%), we notice signs of detachment of the window far before it becomes loose, and the mice will be sacrificed. In the remaining animals, the window loss will be noticed within 24hrs and the mouse will be immediately sacrificed.

Explain why these effects may emerge.

Tumor development, inflicted inflammation, genetic alterations and administration of compounds/ drugs/ chemicals/ toxins.

It is unclear why some animals may lose their windows.

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

Mice with windows will be monitored at least twice a week, mice after bacterial or viral infection will be monitored at least every other day, more if necessary, for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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.

As described in D, F, H and I, the experiments will be set-up in such a way that the incidence of reaching the humane end-point is kept to a minimum.

Weight loss (>20% in comparison with control or original weight or 15% weight loss in two days), reaching a score of 4 on the illness scale (specified below), severe shortness of breath, or loss of window is set as an humane end point. For all tumor models the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed, taking into account e.g. the size, location and ulceration of the tumor(s).

Next to model-specific parameters, an illness grading scale will always be used to score a set of clinical features detected in mice with different degrees of illness:

0: healthy

1: barely ruffled fur

2: ruffled fur, but active

3: ruffled fur and inactive

4: ruffled fur, inactive, hunched, and gaunt

5: dead

Indicate the likely incidence.

Expected <5% and <1day.

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative level of discomfort is dependent on the intervention, the read-out and the animal model. The discomfort of these three range from mild to moderate. Therefore combinations of these result in moderate discomfort for the majority (~90%) of animals.

References for the whole appendix

1. Liese, J., Rooijackers, S. H., van Strijp, J. A., Novick, R. P. & Dustin, M. L. Intravital two-photon microscopy of host-pathogen interactions in a mouse model of Staphylococcus aureus skin abscess formation. *Cell. Microbiol.* **15**, 891-909 (2013).
2. Spaan, A. N. *et al.* The staphylococcal toxins gamma-haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nat. Commun.* **5**, 5438 (2014).
3. Groen, R. W. *et al.* Reconstructing the human hematopoietic niche in immunodeficient mice: opportunities for studying primary multiple myeloma. *Blood* **120**, e9-e16 (2012).
4. Levy, L. *et al.* Splenectomy inhibits non-small cell lung cancer growth by modulating anti-tumor adaptive and innate immune response. *Oncoimmunology* **4**, e998469 (2015).
5. Hasenberg, A. *et al.* Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nat. Methods* **12**, 445-452 (2015).
6. Lagasse, E. & Weissman, I. L. Bcl-2 Inhibits Apoptosis of Neutrophils but Not their Engulfment by Macrophages. *J. Exp. Med.* **179**, 1047-1052 (1994).

7. Coughlan, A. M., Freeley, S. J. & Robson, M. G. Animal models of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **169**, 229-237 (2012).
8. Gubbels Bupp, M. R. Sex, the aging immune system, and chronic disease. *Cell. Immunol.* **294**, 102-110 (2015).
9. Burkholder, T., Foltz, C., Karlsson, E., Linton, C. G. & Smith, J. M. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **2**, 145-165 (2012).
10. Salimi, V. *et al.* Opioid receptors control viral replication in the airways. *Crit. Care Med.* **41**, 205-214 (2013).
11. Sacerdote, P. Opioids and the immune system. *Palliat. Med.* **20 Suppl 1**, s9-15 (2006).
12. Hish, G. A., Diaz, J. A., Hawley, A. E., Myers, D. D. & Lester, P. A. Effects of Analgesic Use on Inflammation and Hematology in a Murine Model of Venous Thrombosis. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **53**, 485-493 (2014).
13. Mundt, S., Groettrup, M. & Basler, M. Analgesia in mice with experimental meningitis reduces pain without altering immune parameters. *ALTEX* **32**, 183-189 (2015).
14. Ritsma L, Steller EJA, Beerling E, et al. (2012) Intravital Microscopy Through an Abdominal Imaging Window Reveals a Pre-Micrometastasis Stage During Liver Metastasis. *Sci Transl Med* 4:158ra145–158ra145.
15. Ritsma L, Steller EJ a, Ellenbroek SIJ, et al. (2013) Surgical implantation of an abdominal imaging window for intravital microscopy. *Nat Protoc* 8:583–94. doi: 10.1038/nprot.2013.026

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.

In order to obtain organs and isolated cells for *ex vivo* analysis the mice must first be 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'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 3	Type of animal procedure Bone marrow scaffold

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.

The objective of this project is to gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and function of neutrophils in diverse inflammatory conditions. In order to achieve this we need to implant a bone marrow scaffold to:

- Visualize the migratory behavior of neutrophils and different neutrophil subsets in the bone marrow. More specifically, we can monitor the recruitment of young banded neutrophils to the circulation upon inflammatory stimuli and establish whether [redacted] through the [redacted] (as our own data in humans predict) or only [redacted] (as has been reported in literature).
- Investigate whether [redacted] can [redacted] or rather that [redacted]

The readout of each animal experiment will consist of some or all of the following:

- descriptive data on single cell level (flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.)
- functional data (on specific functions of the neutrophil such as migration, phagocytosis, etc)
- intravital microscopy data
- descriptive data on disease progression (e.g. weight loss, microbial load, tumor size).

The methods for obtaining these readout parameters will be the same for all experiments in this proposal, but the inflammatory stimulus will differ per experiment. The purpose of our experiments is to compare the neutrophil populations between all the different inflammatory conditions.

Ex vivo analysis:

In order to study the origin and kinetics of the neutrophil populations we need to investigate the different relevant organs. Neutrophils develop in the bone marrow and occasionally the spleen and subsequently migrate through the blood to the inflammatory site. In addition, neutrophils are thought to reside in the

lungs and liver (marginated pool). All these organs are therefore relevant for our studies. Whenever we will perform animal experiments we will therefore harvest multiple organs for our analysis. After the different interventions, tissues can be isolated and analyzed with microscopy. In addition cells can be isolated from the different tissues for further descriptive analysis (e.g. FACS of cell surface expression) and/or for functional assays (e.g. survival assay, bacterial killing capacity, T cell suppression capacity).

This *ex vivo* analysis will allow us to link surface markers between human and mouse neutrophils. Surface marker expression and nuclear morphology allow us to distinguish different neutrophil subsets in mice, in multiple organs. We can see whether the different inflammatory conditions recruit the subsets with similar dynamics. Lastly, using functional *in vitro* assays we can investigate whether the subsets differ in their capacity e.g. to kill microbes and suppress T cell proliferation like we found in humans.

Intravital imaging:

Two different strategies will be used for the imaging experiments: (1) Imaging in an acute experiment under anesthesia and (2) implanting an imaging window (such as on the breast, skin, abdomen and skull) and repeatedly image through that window. For long-term studies the animal needs to be imaged by multiple imaging sessions, and therefore imaging windows are required. From experience we know that the implantation of intracutaneous windows does not lead to post-operative discomfort.

For some research questions, the tissue needs to be visualized frequently for a relative short-period of time (up to max 2 days). It is ethically undesirable to anesthetize the animal multiple times a day, so the animal will be constantly anesthetized. We have a lot of experience in the lab with these procedures, and only well trained researchers will perform these experiments. We have observed homeostatic neutrophils respond normally to stimuli under the conditions of these experiments.

In vivo imaging will allow us to study dynamic processes that are missed in static analysis. Imaging windows allow us to image the same mouse repeatedly over time as opposed to analyzing separate mice at different timepoints, greatly reducing the amount of animals needed. Additionally, this provides paired data, introducing less variation and therefore fewer animals are needed to get statistically significant results.

At the end point of intravital microscopy, tissues will always be analyzed *ex vivo* to reduce the number of mice required.

Procedures: A detailed description of the window surgery, including postoperative assessment of behavior (largely normal scores) and weight (slight decreases 1 day post surgery) is published by Ritsma et al in *Sci Transl Med* 2012 and *Nature Protocols* 2013.^{14, 15} These publications also describe subsequent intermittent intravital imaging. In short, mice will be anesthetized, positioned on a heat pad for proper temperature control and shaved. An incision is made in the skin for the intracutaneous window, while for the abdominal imaging window an incision is made in both skin and peritoneum. The incision is then sutured using a purse-string suture through both layers around the edges, creating four loops and leaving the suture untightened. Next, the window is placed within the incision. Different organs require different fixation techniques.¹⁵ Ultimately, the skin (and peritoneum) are placed in the window groove, and the suture is tightened to fix the window.

For subsequent intravital imaging the mice will also be anesthetized and placed in a custom made imaging box. The microscope is covered by a climate chamber allowing proper temperature control. Saline will be administered subcutaneously (under anesthesia) for imaging sessions of more than an hour.

Symptoms: Mice can experience post-operative pain demonstrated by changed behavior as described in section J. Within 1 day post surgery the majority of animals are found to behave normally. Intravital imaging sessions do not lead to noticeable symptoms.

Level of discomfort: moderate during surgery, mild thereafter for intracutaneous windows, moderate thereafter for abdominal and skull windows.

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

The objective of this project is to gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and function of neutrophils in diverse inflammatory conditions. Below the experimental approach per inflammatory stimulus and the intervention will be described. The choices about mice strains and numbers are further explained in B.

1. Inflammatory stimulus: LPS injection

Justification: LPS is a relatively simple model for acute inflammation with which we have a lot of

experience *in vivo* in humans. It is in this model where we first described the different neutrophil subsets.

Description: Mice receive a single bolus of *E. coli* lipopolysaccharide intravenously (i.v.).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours-days

Procedures: Mice receive a single bolus of *E. coli* lipopolysaccharide intravenously (i.v.) in the tail vein (no anesthesia) or retro-orbitally (while under anesthesia).

Symptoms: Mice are expected to have transient (< 1 day) symptoms associated with an acute inflammatory response such as hypothermia, weight loss and behavioral changes as described in section J.

Level of discomfort: mild or moderate

2. Inflammatory stimulus: Bacterial infection

Justification: Bacterial infection is a more complex, but more physiological relevant model for acute inflammation with which we have a lot of experience *in vitro* in humans.

Description: Mice are infected with (fluorescent) staphylococci via intradermal or intraperitoneal injection as described before^{1, 2}.

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – 2 weeks

Procedures: Intraperitoneal and i.v. vein injections will be performed without anesthesia, whereas intradermal or retro-orbital injections will be performed under anesthesia.

Symptoms: Intradermal injections of bacteria are well tolerated and do not lead to noticeable symptoms. Intraperitoneal or i.v. injection can lead to symptoms associated with an acute inflammatory response such as hypothermia, weight loss and behavioral changes as described in section J.

Level of discomfort: moderate

3. Inflammatory stimulus: Viral infection

Justification: Viral infection is a complex physiological relevant model for inflammation with which we have some experience *in vitro* in humans.

Description: Mice are infected with influenza virus or rhinovirus 16 via intranasal administration, as performed before (Suzanne Bal, personal communication).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – 8 weeks

Procedures: Mice will be lightly anesthetized and drops of saline containing virus will be delivered

intranasally.

Symptoms: Viral infection can lead to symptoms associated with an acute inflammatory response such as hypothermia, weight loss and behavioral changes as described in section J.

Level of discomfort: moderate

4. Inflammatory stimulus: Plastic particles

Justification: The effects of microplastics on human health are currently understudied. We have found neutrophils can engulf microplastics and now want to investigate their effect on neutrophil survival and function.

Description: Microplastics (plastic particles $\leq 1 \mu\text{m}$) are administered via subcutaneous injection, via addition to the drinking water, or via i.v. injection to mimic exposure routes in humans.

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – one year

Procedures: i.v. vein injections will be performed without anesthesia, whereas subcutaneous/intradermal or retro-orbital injections will be performed under anesthesia. Microplastics will also be added to the drinking water.

Symptoms: Intradermal injections of microplastics are well tolerated and do not lead to noticeable symptoms. The effects of i.v. microplastics injection and administration in the drinking water have not been described before, but as these are inert materials they are not expected to cause symptoms. However, weight loss and behavioral changes as described in section J will be tightly monitored.

Level of discomfort: mild or moderate

5. Inflammatory stimulus: Sterile injury

Justification: Sterile injury is known to recruit neutrophils without a pathogenic stimulus. Therefore this can act as a control for pathogen infection or as a model for damage-associated molecular pattern (DAMP) release.

Description: Under anesthesia, sterile injury is inflicted in the skin by needle insertion or laser damage

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours - days

Procedures: The mice will be anesthetized and a sterile damage will be inflicted either by insertion of a sterile needle or by laser damage inflicted by the 2-photon microscope with a setting of much higher laser power and zoom than is used for imaging.

Symptoms: These local inflammations are well tolerated and do not lead to noticeable symptoms. However, behavioral changes as described in section J will be tightly monitored.

Level of discomfort: mild or moderate

6. Inflammatory stimulus: Airway allergy

Justification: Allergy is a complex physiological relevant model for chronic inflammation with which we have a lot of experience in humans.

Description: Mice are sensitized and challenged with house dust mite by intranasal administration, as performed before (Suzanne Bal, personal communication).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: 2 – 8 weeks

Procedures: Mice will be lightly anesthetized and drops of saline containing allergens (eg house dust mite) will be delivered intranasally 5 days a week for 5 consecutive weeks.

Symptoms: Allergen administration is generally well tolerated and does not lead to noticeable symptoms. However, repetitive anesthesia will cause some discomfort. Behavioral changes as described in section J will be tightly monitored.

Level of discomfort: mild to moderate

7. Inflammatory stimulus: Solid tumor growth

Justification: Cancer is a complex physiological relevant model for chronic inflammation. The suppressive neutrophil has been described in this model.

Description: We use genetic mouse models for breast or colorectal cancer, or transfer tumor cells/pieces from these mouse models to healthy mice of the same background to increase reproducibility or for intravital imaging.

Mice: Spontaneous tumor models or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – months

Procedures: Genetic mouse models will spontaneously develop tumors or will require i.p. tamoxifen administration for tumor initiation. I.p. injections will not be performed under anesthesia. Tumor cells can be injected or tumor pieces can be positioned at different locations (e.g. mammary gland, liver, intestine, brain, mesenteric vein) under anesthesia.

Symptoms: Mice can experience post-operative pain for 1 day after surgery. Small tumors are generally well tolerated and do not lead to noticeable symptoms. Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. For all tumor models the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed, taking into account e.g. the size, location and ulceration of the tumor(s). Behavioral changes as described in section J will be tightly monitored.

Level of discomfort: mild or moderate

These different inflammatory stimuli will be combined with the intervention described here and/or with interventions A/B/D, as described in the project proposal.

Intervention C: Bone marrow scaffold

Description: Biphasic calcium phosphate particles loaded with human MSCs will be implanted subcutaneously in immunodeficient mice to create a niche for hematopoiesis.

Rationale: To study neutrophil progenitors and differentiation. Intravital imaging of the bone marrow compartment is hard due to the solid thick nature of the surrounding bone. In a pilot study we have successfully placed an imaging window on a subcutaneous bone marrow scaffold allowing the visualization of cells in the bone marrow³.

E.g. we will be able to visualize neutrophils exiting (milestone vi) or re-entering (milestone viii) the bone marrow

Extra experimental groups: With vs. without bone marrow scaffold.

Number of mice per group: as described per inflammatory stimulus

Duration of intervention: days - months

Procedures: Mice will be anesthetized, positioned on a heat pad for proper temperature control and shaved before making a small incision in the skin. An *in vitro* generated bone marrow scaffold will be

transplanted subcutaneously and the small incision will be closed with an absorbable suture.

Symptoms: None (besides mild symptoms possibly caused by the anesthesia).

Level of discomfort: moderate during surgery, mild thereafter

The final level of discomfort depends on the inflammatory stimulus, whether the intervention is used in combination with other interventions and the choice of the readout parameter. Harvesting of organs for *ex vivo* analysis or single session intravital imaging will result only in mild discomfort, but repeated intravital imaging will probably result in moderate discomfort.

The experimental design and the exact number of animals of each experiment is determined and described in detail in a work protocol according to the advice from the Animal Welfare Body and a statistician.

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

When possible, blinding and randomization will be used to prevent bias as much as possible. For example, videos obtained with intravital imaging can be coded by an independent colleague before image analysis by the researcher.

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$. Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based on literature and/or years of experience with similar type of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

B. The animals

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

Since for our experiments the different interventions described in the different appendices will be combined, it is difficult to pinpoint the estimated numbers per intervention. Therefore here we describe the grand total of estimated numbers for our whole project.

Species: *Mus musculus*

Origin: Common breeding facility (Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium) at Utrecht University/Hubrecht institute/external licensed breeders

Estimated numbers: max. 2850

Life stages: adults

Species

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand neutrophil development, homeostasis and response to inflammation in the context of the whole organism. For the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) physiology is more extensively characterized than other animal models; (2) a large number of relevant transgenic and knock out lines is already available; (3) a large number of relevant antibodies and other compounds is already available; (4) our research shows murine neutrophils are representative for human neutrophils; (5) many procedures for intravital imaging have already been described. The zebrafish is also an animal widely used for intravital imaging, but the differentiation of zebrafish neutrophils is much less similar to human neutrophils. Since mice are mammals too, they are closer to the human.

Mice strains used are amongst others:

- Wildtype BL/6
- Wildtype Balb/c
- Wildtype FVB
- LysM-GFP mice; for visualization of fluorescent neutrophils in intravital imaging. We are already working with this strain.
- Catchup^{I^{VM}} mice (Ly6G-Cre + Rosa-Td- Tomato); for visualization of fluorescent neutrophils in intravital imaging and for conditional knockouts in neutrophils⁵. This strain was very recently created, we want to import this strain. If the results will be superior to LysM-GFP mice, we will switch to this strain.

- MRP/S100A8-Tg-EGFP-Cre; for conditional knockouts in neutrophil progenitors⁶. We want to import this strain. As opposed to the Catchup^{IVM} mice, Cre recombinase is expressed in granulocyte-macrophage progenitors in the bone marrow.
- Knockout mice (e.g. CD11b-knockout mice); to investigate the role of a specific gene or protein
- Tumor models such as MMTV-PyMT, MMTV-Wnt1 or C26 colorectal cancer mice. In our currently running animal experiments we are comparing different tumor models with each other, to optimize for future experiments. Therefore we have not completely decided which tumor models we will use in the next five years, but it will be a model that is similar in execution and discomfort as the here mentioned examples.
- Humanized mice⁷ or immunocompromised mice (e.g. NSG mice); to investigate the behavior of human neutrophils in an *in vivo*-like situation.

If the required genetically modified mouse is not available, we will obtain this model by generating, importing or by crossing existing models. Other strains will be used when in the next five years, novel strains are described or created that are very relevant to our hypotheses.

Estimated numbers

Our experiments can be divided into:

- Descriptive analysis (5-15 animals x max 5 time points = max 75 animals)
- Functional assays (5-15 animals x max 5 time points = max 75 animals)
- Intravital imaging (5-10 animals)

This totals to 55-160 animals

However, we have 7 inflammatory stimuli, 4 interventions and no intervention per stimuli = 35 conditions.

So for the total we have to multiply the 55-160 animals with 35 = 1925-5600 animals

However, these numbers are overestimations because:

- Controls can be shared between experiments when these are performed simultaneously
- Descriptive single cell and functional assays will be combined when neutrophil numbers allow this
- When differences between groups turn out to be very striking, we do not need the maximum number of mice per group
- Successful pilot studies may be included in the dataset

Therefore we do not anticipate we will need more than 2500 mice for the experiments.

Additionally, a number of ca. 350 mice is needed for:

	Estimated nr
Maintenance of breeding	100
Pilot studies for validation of models/techniques#	50
Training of new personnel or new techniques	50
Rederivation of imported strains via embryo transfer	100
To compensate for unforeseen loss of animals*	50

*(max 10%, e.g. due to location not suitable for imaging, problems with the window)

#Only procedures mentioned in this project proposal

Mice that become surplus during breeding, will be used for pilot studies and training purposes.

Together we therefore anticipate we need a grand total of 2850 mice.

Sex

In general, we will try to use both male and female mice. However, it is clear that the immune response of males and females can greatly differ⁸. Therefore, we will perform pilot studies to ensure that the sex of the animal does not pose a bias in answering the particular research question. These pilots may prove it necessary to use only one sex within one animal experiment, to be able to reliably compare experimental groups.

One clear exception is the MMTV-PyMT breast cancer model; in this model only female mice consistently develop breast tumors.

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:

Immune responses are highly complex and multifaceted. Multiple compartments such as the bone marrow, spleen, endothelial wall and inflamed tissue interact. Certain aspects of the immune response can be separately simulated *in vitro*, but it is not yet possible to study the full course of infection and the elicited immune response *in vitro*. This requires animal models. Similarly, the use of experimental interventions to test their potential beneficial impact on the course of disease can only be assessed in animal models. Clearly, such experimental interventions cannot be performed in patients, while *in vitro* studies with isolated human cells do not capture the full complexity of infection. However, before turning to mice, we will first study human cells *in vitro* to ensure we only perform the most relevant experiments in mice.

Reduction:

Intravital imaging using imaging windows allows us to image the same mouse repeatedly over time as opposed to analyzing separate mice at different timepoints greatly reducing the amount of animals needed. Additionally, this provides paired data, introducing less variation and therefore fewer animals are needed to get statistical significant results. Statistical power calculation based on our own previous experience and literature will be used to determine the optimal number of mice for each experimental group. Moreover, experiments will be performed sequentially, based on the described go/no-go decisions, via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative. Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible.

Refinement:

Except for mice with windows, where co-housing can give problems, mice will be housed in groups in cages. Nesting opportunities will always be provided. Mice with windows will be monitored at least twice a week, mice after bacterial or viral infection will be monitored at least every other day, more if necessary, for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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

As described under refinement, mice welfare will be regularly monitored. Mice reaching the humane endpoints or otherwise suffering from severe discomfort will be euthanized. New personnel will be trained to recognize discomfort in mice according to current guidelines (e.g. ⁹). Surgical exposure will be performed under aseptic conditions using sterile instruments. Heating devices will be used to ensure a stable body temperature of the mouse during anaesthesia. Personnel conducting the surgeries is first properly trained, starting with training on cadavers.

Surgical exposure will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Pre- and post-procedural analgesia will be used when indicated or when pain-related behavior is observed. However, common analgesics such as opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to significantly alter the immune response¹⁰⁻¹². Since this is our main research topic, we might sometimes refrain from using analgesia. It may be necessary to do pilot studies to prove whether analgesics pose a bias in answering our particular research question. From literature, it seems buprenorphine may be a reasonable candidate¹³.

There are no expected adverse effects on the environment.

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.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

Mice with an imaging window will be housed individually to prevent other mice from biting or damaging the window.

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Surgical exposure will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Pre- and post-procedural analgesia will be used when indicated or when pain-related behavior is observed. However, common analgesics such as opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to significantly alter the immune response¹⁰⁻¹². Since this is our main research topic, we might sometimes refrain from using analgesia. However, pain can also influence the immune system. Therefore, it may be necessary to do pilot studies to prove whether analgesics pose a bias in answering our particular research question.

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

Surgical exposure will be performed under aseptic conditions using sterile instruments. Heating devices will be used to ensure a stable body temperature of the mouse during anaesthesia. Personnel conducting the surgeries is first properly trained, starting with training on cadavers. Before, during and after surgery adequate anesthesia and analgesia (e.g. isoflurane and buprenorphine) will be used, according to experience as well as published protocols. New personnel will be trained to recognize discomfort in mice according to current guidelines (e.g. ⁹).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will consist of a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than moderate discomfort. Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. All relevant scientific data can and will be gathered *before* the cancer, infection or allergy studies reach a level of severe discomfort. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized. It is expected that no animals (0%) will be experiencing more than mild discomfort due to the genetic

modification. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect. So, in all cases, animals will be carefully monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day and analyzed when possible. Animals may lose their window (<5%). In the vast majority of these animals (>95%), we notice signs of detachment of the window far before it becomes loose, and the mice will be sacrificed. In the remaining animals, the window loss will be noticed within 24hrs and the mouse will be immediately sacrificed.

Explain why these effects may emerge.

Tumor development, inflicted inflammation, genetic alterations and administration of compounds/ drugs/ chemicals/ toxins.

It is unclear why some animals may lose their windows.

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

Mice with windows will be monitored at least twice a week, mice after bacterial or viral infection will be monitored at least every other day, more if necessary, for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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.

As described in D, F, H and I, the experiments will be set-up in such a way that the incidence of reaching the humane end-point is kept to a minimum.

Weight loss (>20% in comparison with control or original weight or 15% weight loss in two days), reaching a score of 4 on the illness scale (specified below), severe shortness of breath, or loss of window is set as an humane end point. For all tumor models the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed, taking into account e.g. the size, location and ulceration of the tumor(s).

Next to model-specific parameters, an illness grading scale will always be used to score a set of clinical features detected in mice with different degrees of illness:

0: healthy

1: barely ruffled fur

2: ruffled fur, but active

3: ruffled fur and inactive

4: ruffled fur, inactive, hunched, and gaunt

5: dead

Indicate the likely incidence.

Expected <5% and <1day.

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative level of discomfort is dependent on the intervention, the read-out and the animal model. The discomfort of these three range from mild to moderate. Therefore combinations of these result in moderate discomfort for the majority (~90%) of animals.

References for the whole appendix

1. Liese, J., Rooijackers, S. H., van Strijp, J. A., Novick, R. P. & Dustin, M. L. Intravital two-photon microscopy of host-pathogen interactions in a mouse model of Staphylococcus aureus skin abscess formation. *Cell. Microbiol.* **15**, 891-909 (2013).
2. Spaan, A. N. *et al.* The staphylococcal toxins gamma-haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nat. Commun.* **5**, 5438 (2014).
3. Groen, R. W. *et al.* Reconstructing the human hematopoietic niche in immunodeficient mice: opportunities for studying primary multiple myeloma. *Blood* **120**, e9-e16 (2012).
4. Levy, L. *et al.* Splenectomy inhibits non-small cell lung cancer growth by modulating anti-tumor adaptive and innate immune response. *Oncimmunology* **4**, e998469 (2015).
5. Hasenberg, A. *et al.* Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nat. Methods* **12**, 445-452 (2015).
6. Lagasse, E. & Weissman, I. L. Bcl-2 Inhibits Apoptosis of Neutrophils but Not their Engulfment by Macrophages. *J.*

Exp. Med. **179**, 1047-1052 (1994).

7. Coughlan, A. M., Freeley, S. J. & Robson, M. G. Animal models of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **169**, 229-237 (2012).

8. Gubbels Bupp, M. R. Sex, the aging immune system, and chronic disease. *Cell. Immunol.* **294**, 102-110 (2015).

9. Burkholder, T., Foltz, C., Karlsson, E., Linton, C. G. & Smith, J. M. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **2**, 145-165 (2012).

10. Salimi, V. *et al.* Opioid receptors control viral replication in the airways. *Crit. Care Med.* **41**, 205-214 (2013).

11. Sacerdote, P. Opioids and the immune system. *Palliat. Med.* **20 Suppl 1**, s9-15 (2006).

12. Hish, G. A., Diaz, J. A., Hawley, A. E., Myers, D. D. & Lester, P. A. Effects of Analgesic Use on Inflammation and Hematology in a Murine Model of Venous Thrombosis. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **53**, 485-493 (2014).

13. Mundt, S., Groettrup, M. & Basler, M. Analgesia in mice with experimental meningitis reduces pain without altering immune parameters. *ALTEX* **32**, 183-189 (2015).

14. Ritsma L, Steller EJA, Beerling E, et al. (2012) Intravital Microscopy Through an Abdominal Imaging Window Reveals a Pre-Micrometastasis Stage During Liver Metastasis. *Sci Transl Med* 4:158ra145–158ra145.

15. Ritsma L, Steller EJ a, Ellenbroek SIJ, et al. (2013) Surgical implantation of an abdominal imaging window for intravital microscopy. *Nat Protoc* 8:583–94. doi: 10.1038/nprot.2013.026

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.

In order to obtain organs and isolated cells for *ex vivo* analysis the mice must first be 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'.	11500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 4	Type of animal procedure Splenectomy

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.

The objective of this project is to gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and function of neutrophils in diverse inflammatory conditions. We hypothesize that the [redacted] in the [redacted] (milestone ix). Although the dogma is that these cells are [redacted], our preliminary data [redacted] are [redacted], suggesting these cells either come directly from the spleen and not the [redacted] or alternatively [redacted]. To confirm this we need to perform splenectomy in mice.

The readout of each animal experiment will consist of some or all of the following:

- descriptive data on single cell level (flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.)
- functional data (on specific functions of the neutrophil such as migration, phagocytosis, etc)
- intravital microscopy data
- descriptive data on disease progression (e.g. weight loss, microbial load, tumor size).

The methods for obtaining these readout parameters will be the same for all experiments in this proposal, but the inflammatory stimulus will differ per experiment. The purpose of our experiments is to compare the neutrophil populations between all the different inflammatory conditions.

Ex vivo analysis:

In order to study the origin and kinetics of the neutrophil populations we need to investigate the different relevant organs. Neutrophils develop in the bone marrow and occasionally the spleen and subsequently migrate through the blood to the inflammatory site. In addition, neutrophils are thought to reside in the lungs and liver (marginated pool). All these organs are therefore relevant for our studies. Whenever we will perform animal experiments we will therefore harvest multiple organs for our analysis. After the different interventions, tissues can be isolated and analyzed with microscopy. In addition cells

can be isolated from the different tissues for further descriptive analysis (e.g. FACS of cell surface expression) and/or for functional assays (e.g. survival assay, bacterial killing capacity, T cell suppression capacity).

This *ex vivo* analysis will allow us to link surface markers between human and mouse neutrophils. Surface marker expression and nuclear morphology allow us to distinguish different neutrophil subsets in mice, in multiple organs. We can see whether the different inflammatory conditions recruit the subsets with similar dynamics. Lastly, using functional *in vitro* assays we can investigate whether the subsets differ in their capacity e.g. to kill microbes and suppress T cell proliferation like we found in humans.

Intravital imaging:

Two different strategies will be used for the imaging experiments: (1) Imaging in an acute experiment under anesthesia and (2) implanting an imaging window (such as on the breast, skin, abdomen and skull) and repeatedly image through that window. For long-term studies the animal needs to be imaged by multiple imaging sessions, and therefore imaging windows are required. From experience we know that the implantation of intracutaneous windows does not lead to post-operative discomfort.

For some research questions, the tissue needs to be visualized frequently for a relative short-period of time (up to max 2 days). It is ethically undesirable to anesthetize the animal multiple times a day, so the animal will be constantly anesthetized. We have a lot of experience in the lab with these procedures, and only well trained researchers will perform these experiments. We have observed homeostatic neutrophils respond normally to stimuli under the conditions of these experiments.

In vivo imaging will allow us to study dynamic processes that are missed in static analysis. Imaging windows allow us to image the same mouse repeatedly over time as opposed to analyzing separate mice at different timepoints, greatly reducing the amount of animals needed. Additionally, this provides paired data, introducing less variation and therefore fewer animals are needed to get statistically significant results.

At the end point of intravital microscopy, tissues will always be analyzed *ex vivo* to reduce the number of mice required.

Procedures: A detailed description of the window surgery, including postoperative assessment of behavior (largely normal scores) and weight (slight decreases 1 day post surgery) is published by Ritsma et al in *Sci Transl Med* 2012 and *Nature Protocols* 2013.^{14, 15} These publications also describe subsequent intermittent intravital imaging. In short, mice will be anesthetized, positioned on a heat pad for proper temperature control and shaved. An incision is made in the skin for the intracutaneous window, while for the abdominal imaging window an incision is made in both skin and peritoneum. The incision is then sutured using a purse-string suture through both layers around the edges, creating four loops and leaving the suture untightened. Next, the window is placed within the incision. Different organs require different fixation techniques.¹⁵ Ultimately, the skin (and peritoneum) are placed in the window groove, and the suture is tightened to fix the window.

For subsequent intravital imaging the mice will also be anesthetized and placed in a custom made imaging box. The microscope is covered by a climate chamber allowing proper temperature control. Saline will be administered subcutaneously (under anesthesia) for imaging sessions of more than an hour.

Symptoms: Mice can experience post-operative pain demonstrated by changed behavior as described in section J. Within 1 day post surgery the majority of animals are found to behave normally. Intravital imaging sessions do not lead to noticeable symptoms.

Level of discomfort: moderate during surgery, mild thereafter for intracutaneous windows, moderate thereafter for abdominal and skull windows.

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

The objective of this project is to gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and function of neutrophils in diverse inflammatory conditions. Below the experimental approach per inflammatory stimulus and the intervention will be described. The choices about mice strains and numbers are further explained in B.

1. Inflammatory stimulus: LPS injection

Justification: LPS is a relatively simple model for acute inflammation with which we have a lot of experience in vivo in humans. It is in this model where we first described the different neutrophil subsets.

Description: Mice receive a single bolus of E. coli lipopolysaccharide intravenously (i.v.).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours-days

Procedures: Mice receive a single bolus of E. coli lipopolysaccharide intravenously (i.v.) in the tail vein (no anesthesia) or retro-orbitally (while under anesthesia).

Symptoms: Mice are expected to have transient (< 1 day) symptoms associated with an acute inflammatory response such as hypothermia, weight loss and behavioral changes as described in section J.

Level of discomfort: mild or moderate

2. Inflammatory stimulus: Bacterial infection

Justification: Bacterial infection is a more complex, but more physiological relevant model for acute inflammation with which we have a lot of experience *in vitro* in humans.

Description: Mice are infected with (fluorescent) staphylococci via intradermal or intraperitoneal injection as described before^{1, 2}.

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – 2 weeks

Procedures: Intraperitoneal and i.v. vein injections will be performed without anesthesia, whereas intradermal or retro-orbital injections will be performed under anesthesia.

Symptoms: Intradermal injections of bacteria are well tolerated and do not lead to noticeable symptoms. Intraperitoneal or i.v. injection can lead to symptoms associated with an acute inflammatory response such as hypothermia, weight loss and behavioral changes as described in section J.

Level of discomfort: moderate

3. Inflammatory stimulus: Viral infection

Justification: Viral infection is a complex physiological relevant model for inflammation with which we have some experience *in vitro* in humans.

Description: Mice are infected with influenza virus or rhinovirus 16 via intranasal administration, as performed before (Suzanne Bal, personal communication).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – 8 weeks

Procedures: Mice will be lightly anesthetized and drops of saline containing virus will be delivered intranasally.

Symptoms: Viral infection can lead to symptoms associated with an acute inflammatory response such as

hypothermia, weight loss and behavioral changes as described in section J.

Level of discomfort: moderate

4. Inflammatory stimulus: Plastic particles

Justification: The effects of microplastics on human health are currently understudied. We have found neutrophils can engulf microplastics and now want to investigate their effect on neutrophil survival and function.

Description: Microplastics (plastic particles $\leq 1 \mu\text{m}$) are administered via subcutaneous injection, via addition to the drinking water, or via i.v. injection to mimic exposure routes in humans.

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – one year

Procedures: i.v. vein injections will be performed without anesthesia, whereas subcutaneous/intradermal or retro-orbital injections will be performed under anesthesia. Microplastics will also be added to the drinking water.

Symptoms: Intradermal injections of microplastics are well tolerated and do not lead to noticeable symptoms. The effects of i.v. microplastics injection and administration in the drinking water have not been described before, but as these are inert materials they are not expected to cause symptoms. However, weight loss and behavioral changes as described in section J will be tightly monitored.

Level of discomfort: mild or moderate

5. Inflammatory stimulus: Sterile injury

Justification: Sterile injury is known to recruit neutrophils without a pathogenic stimulus. Therefore this can act as a control for pathogen infection or as a model for damage-associated molecular pattern (DAMP) release.

Description: Under anesthesia, sterile injury is inflicted in the skin by needle insertion or laser damage

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours - days

Procedures: The mice will be anesthetized and a sterile damage will be inflicted either by insertion of a sterile needle or by laser damage inflicted by the 2-photon microscope with a setting of much higher laser power and zoom than is used for imaging.

Symptoms: These local inflammations are well tolerated and do not lead to noticeable symptoms. However, behavioral changes as described in section J will be tightly monitored.

Level of discomfort: mild or moderate

6. Inflammatory stimulus: Airway allergy

Justification: Allergy is a complex physiological relevant model for chronic inflammation with which we have a lot of experience in humans.

Description: Mice are sensitized and challenged with house dust mite by intranasal administration, as performed before (Suzanne Bal, personal communication).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein

expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: 2 – 8 weeks

Procedures: Mice will be lightly anesthetized and drops of saline containing allergens (eg house dust mite) will be delivered intranasally 5 days a week for 5 consecutive weeks.

Symptoms: Allergen administration is generally well tolerated and does not lead to noticeable symptoms. However, repetitive anesthesia will cause some discomfort. Behavioral changes as described in section J will be tightly monitored.

Level of discomfort: mild or moderate

7. Inflammatory stimulus: Solid tumor growth

Justification: Cancer is a complex physiological relevant model for chronic inflammation. The suppressive neutrophil has been described in this model.

Description: We use genetic mouse models for breast or colorectal cancer, or transfer tumor cells/pieces from these mouse models to healthy mice of the same background to increase reproducibility or for intravital imaging.

Mice: Spontaneous tumor models or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – months

Procedures: Genetic mouse models will spontaneously develop tumors or will require i.p. tamoxifen administration for tumor initiation. I.p. injections will not be performed under anesthesia. Tumor cells can be injected or tumor pieces can be positioned at different locations (e.g. mammary gland, liver, intestine, brain, mesenteric vein) under anesthesia.

Symptoms: Mice can experience post-operative pain for 1 day after surgery. Small tumors are generally well tolerated and do not lead to noticeable symptoms. Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. For all tumor models the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed, taking into account e.g. the size, location and ulceration of the tumor(s). Behavioral changes as described in section J will be tightly monitored.

Level of discomfort: mild or moderate

These different inflammatory stimuli will be combined with the intervention described here and/or with interventions A/B/C, as described in the project proposal.

Intervention D: Splenectomy

Description: Surgery to remove the spleen is performed as described before⁴.

Rationale: Since we hypothesize that the [REDACTED] and neutrophil [REDACTED] (milestone ix), we will study the effect of [REDACTED]. Data from [REDACTED]

suggest that the [REDACTED] to the [REDACTED].

Extra experimental groups: Splenectomized vs. non-splenectomized

Number of mice per group: as described per inflammatory stimulus.

Duration of intervention: hours

Level of discomfort: moderate during surgery, mild thereafter

The final level of discomfort depends on the inflammatory stimulus, whether the intervention is used in combination with other interventions and the choice of the readout parameter. Harvesting of organs for *ex vivo* analysis or single session intravital imaging will result only in mild discomfort, but repeated intravital imaging will probably result in moderate discomfort.

The experimental design and the exact number of animals of each experiment is determined and described in detail in a work protocol according to the advice from the Animal Welfare Body and a statistician.

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

When possible, blinding and randomization will be used to prevent bias as much as possible. For example, videos obtained with intravital imaging can be coded by an independent colleague before image analysis by the researcher.

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$. Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based on literature and/or years of experience with similar type of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

B. The animals

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

Since for our experiments the different interventions described in the different appendices will be combined, it is difficult to pinpoint the estimated numbers per intervention. Therefore here we describe the grand total of estimated numbers for our whole project.

Species: *Mus musculus*

Origin: Common breeding facility (Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium) at Utrecht University/Hubrecht institute/external licensed breeders

Estimated numbers: max. 2850

Life stages: adults

Species

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand neutrophil development, homeostasis and response to inflammation in the context of the whole organism. For the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) physiology is more extensively characterized than other animal models; (2) a large number of relevant transgenic and knock out lines is already available; (3) a large number of relevant antibodies and other compounds is already available; (4) our research shows murine neutrophils are representative for human neutrophils; (5) many procedures for intravital imaging have already been described. The zebrafish is also an animal widely used for intravital imaging, but the differentiation of zebrafish neutrophils is much less similar to human neutrophils. Since mice are mammals too, they are closer to the human.

Mice strains used are amongst others:

- Wildtype BL/6
- Wildtype Balb/c
- Wildtype FVB
- LysM-GFP mice; for visualization of fluorescent neutrophils in intravital imaging. We are already working with this strain.
- Catchup^{IVM} mice (Ly6G-Cre + Rosa-Td-Tomato); for visualization of fluorescent neutrophils in intravital imaging and for conditional knockouts in neutrophils⁵. This strain was very recently created, we want to import this strain. If the results will be superior to LysM-GFP mice, we will switch to this strain.
- MRP/S100A8-Tg-EGFP-Cre; for conditional knockouts in neutrophil progenitors⁶. We want to import this strain. As opposed to the Catchup^{IVM} mice, Cre recombinase is expressed in granulocyte-macrophage progenitors in the bone marrow.
- Knockout mice (e.g. CD11b-knockout mice); to investigate the role of a specific gene or protein
- Tumor models such as MMTV-PyMT, MMTV-Wnt1 or C26 colorectal cancer mice. In our currently running animal experiments we are comparing different tumor models with each other, to optimize for future experiments. Therefore we have not completely decided which tumor models we will use in the next five years, but it will be a model that is similar in execution and discomfort as the here mentioned examples.

- Humanized mice⁷ or immunocompromised mice (e.g. NSG mice); to investigate the behavior of human neutrophils in an *in vivo*-like situation.

If the required genetically modified mouse is not available, we will obtain this model by generating, importing or by crossing existing models. Other strains will be used when in the next five years, novel strains are described or created that are very relevant to our hypotheses.

Estimated numbers

Our experiments can be divided into:

- Descriptive analysis (5-15 animals x max 5 time points = max 75 animals)
- Functional assays (5-15 animals x max 5 time points = max 75 animals)
- Intravital imaging (5-10 animals)

This totals to 55-160 animals

However, we have 7 inflammatory stimuli, 4 interventions and no intervention per stimuli = 35 conditions.

So for the total we have to multiply the 55-160 animals with 35 = 1925-5600 animals

However, these numbers are overestimations because:

- Controls can be shared between experiments when these are performed simultaneously
- Descriptive single cell and functional assays will be combined when neutrophil numbers allow this
- When differences between groups turn out to be very striking, we do not need the maximum number of mice per group
- Successful pilot studies may be included in the dataset

Therefore we do not anticipate we will need more than 2500 mice for the experiments.

Additionally, a number of ca. 350 mice is needed for:

	Estimated nr
Maintenance of breeding	100
Pilot studies for validation of models/techniques#	50
Training of new personnel or new techniques	50
Rederivation of imported strains via embryo transfer	100
To compensate for unforeseen loss of animals*	50

*(max 10%, e.g. due to location not suitable for imaging, problems with the window)

#Only procedures mentioned in this project proposal

Mice that become surplus during breeding, will be used for pilot studies and training purposes.

Together we therefore anticipate we need a grand total of 2850 mice.

Sex

In general, we will try to use both male and female mice. However, it is clear that the immune response of males and females can greatly differ⁸. Therefore, we will perform pilot studies to ensure that the sex of the animal does not pose a bias in answering the particular research question. These pilots may prove it necessary to use only one sex within one animal experiment, to be able to reliably compare experimental groups.

One clear exception is the MMTV-PyMT breast cancer model; in this model only female mice consistently develop breast tumors.

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:

Immune responses are highly complex and multifaceted. Multiple compartments such as the bone marrow, spleen, endothelial wall and inflamed tissue interact. Certain aspects of the immune response can be separately simulated *in vitro*, but it is not yet possible to study the full course of infection and the elicited immune response *in vitro*. This requires animal models. Similarly, the use of experimental interventions to test their potential beneficial impact on the course of disease can only be assessed in animal models. Clearly, such experimental interventions cannot be performed in patients, while *in vitro* studies with isolated human cells do not capture the full complexity of infection. However, before turning to mice, we will first study human cells *in vitro* to ensure we only perform the most relevant experiments in mice.

Reduction:

Intravital imaging using imaging windows allows us to image the same mouse repeatedly over time as opposed to analyzing separate mice at different timepoints greatly reducing the amount of animals needed. Additionally, this provides paired data, introducing less variation and therefore fewer animals are needed to get statistical significant results. Statistical power calculation based on our own previous experience and literature will be used to determine the optimal number of mice for each experimental group. Moreover, experiments will be performed sequentially, based on the described go/no-go decisions, via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative. Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible.

Refinement:

Except for mice with windows, where co-housing can give problems, mice will be housed in groups in cages. Nesting opportunities will always be provided. Mice with windows will be monitored at least twice a week, mice after bacterial or viral infection will be monitored at least every other day, more if necessary, for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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

As described under refinement, mice welfare will be regularly monitored. Mice reaching the humane endpoints or otherwise suffering from severe discomfort will be euthanized. New personnel will be trained to recognize discomfort in mice according to current guidelines (e.g. ⁹). Surgical exposure will be performed under aseptic conditions using sterile instruments. Heating devices will be used to ensure a stable body temperature of the mouse during anaesthesia. Personnel conducting the surgeries is first properly trained, starting with training on cadavers.

Surgical exposure will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Pre- and post-procedural analgesia will be used when indicated or when pain-related behavior is observed. However, common analgesics such as opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to significantly alter the immune response¹⁰⁻¹². Since this is our main research topic, we might sometimes refrain from using analgesia. It may be necessary to do pilot studies to prove whether analgesics pose a bias in answering our particular research question. From literature, it seems buprenorphine may be a reasonable candidate¹³.

There are no expected adverse effects on the environment.

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.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

Mice with an imaging window will be housed individually to prevent other mice from biting or damaging the window.

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Surgical exposure will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Pre- and post-procedural analgesia will be used when indicated or when pain-related behavior is observed. However, common analgesics such as opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to significantly alter the immune response¹⁰⁻¹². Since this is our main research topic, we might sometimes refrain from using analgesia. However, pain can also influence the immune system. Therefore, it may be necessary to do pilot studies to prove whether analgesics pose a bias in answering our particular research question.

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

Surgical exposure will be performed under aseptic conditions using sterile instruments. Heating devices will be used to ensure a stable body temperature of the mouse during anaesthesia. Personnel conducting the surgeries is first properly trained, starting with training on cadavers. Before, during and after surgery adequate anesthesia and analgesia (e.g. isoflurane and buprenorphine) will be used, according to experience as well as published protocols. New personnel will be trained to recognize discomfort in mice according to current guidelines (e.g. ⁹).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will consist of a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than moderate discomfort. Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. All relevant scientific data can and will be gathered *before* the cancer, infection or allergy studies reach a level of severe discomfort. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

It is expected that no animals (0%) will be experiencing more than mild discomfort due to the genetic modification. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect. So, in all cases, animals will be careful monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day and analyzed when possible.

Animals may lose their window (<5%). In the vast majority of these animals (>95%), we notice signs of detachment of the window far before it becomes lose, and the mice will be sacrificed. In the remaining animals, the window loss will be noticed within 24hrs and the mouse will be immediately sacrificed.

Explain why these effects may emerge.

Tumor development, inflicted inflammation, genetic alterations and administration of compounds/ drugs/ chemicals/ toxins.

It is unclear why some animals may lose their windows.

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

Mice with windows will be monitored at least twice a week, mice after bacterial or viral infection will be monitored at least every other day, more if necessary, for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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.

As described in D, F, H and I, the experiments will be set-up in such a way that the incidence of reaching the humane end-point is kept to a minimum.

Weight loss (>20% in comparison with control or original weight or 15% weight loss in two days), reaching a score of 4 on the illness scale (specified below), severe shortness of breath, or loss of window is set as an humane end point. For all tumor models the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed, taking into account e.g. the size, location and ulceration of the tumor(s).

Next to model-specific parameters, an illness grading scale will always be used to score a set of clinical features detected in mice with different degrees of illness:

0: healthy

1: barely ruffled fur

2: ruffled fur, but active

3: ruffled fur and inactive

4: ruffled fur, inactive, hunched, and gaunt

5: dead

Indicate the likely incidence.

Expected <5% and <1day.

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative level of discomfort is dependent on the intervention, the read-out and the animal model. The discomfort of these three range from mild to moderate. Therefore combinations of these result in moderate discomfort for the majority (~90%) of animals.

References for the whole appendix

1. Liese, J., Rooijackers, S. H., van Strijp, J. A., Novick, R. P. & Dustin, M. L. Intravital two-photon microscopy of host-pathogen interactions in a mouse model of Staphylococcus aureus skin abscess formation. *Cell. Microbiol.* **15**, 891-909 (2013).
2. Spaan, A. N. *et al.* The staphylococcal toxins gamma-haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nat. Commun.* **5**, 5438 (2014).
3. Groen, R. W. *et al.* Reconstructing the human hematopoietic niche in immunodeficient mice: opportunities for studying primary multiple myeloma. *Blood* **120**, e9-e16 (2012).
4. Levy, L. *et al.* Splenectomy inhibits non-small cell lung cancer growth by modulating anti-tumor adaptive and innate immune response. *Oncoimmunology* **4**, e998469 (2015).
5. Hasenberg, A. *et al.* Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nat. Methods* **12**, 445-452 (2015).
6. Lagasse, E. & Weissman, I. L. Bcl-2 Inhibits Apoptosis of Neutrophils but Not their Engulfment by Macrophages. *J. Exp. Med.* **179**, 1047-1052 (1994).
7. Coughlan, A. M., Freeley, S. J. & Robson, M. G. Animal models of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **169**, 229-237 (2012).
8. Gubbels Bupp, M. R. Sex, the aging immune system, and chronic disease. *Cell. Immunol.* **294**, 102-110 (2015).
9. Burkholder, T., Foltz, C., Karlsson, E., Linton, C. G. & Smith, J. M. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **2**, 145-165 (2012).
10. Salimi, V. *et al.* Opioid receptors control viral replication in the airways. *Crit. Care Med.* **41**, 205-214 (2013).
11. Sacerdote, P. Opioids and the immune system. *Palliat. Med.* **20 Suppl 1**, s9-15 (2006).
12. Hish, G. A., Diaz, J. A., Hawley, A. E., Myers, D. D. & Lester, P. A. Effects of Analgesic Use on Inflammation and

Hematology in a Murine Model of Venous Thrombosis. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **53**, 485-493 (2014).

13. Mundt, S., Groettrup, M. & Basler, M. Analgesia in mice with experimental meningitis reduces pain without altering immune parameters. *ALTEX* **32**, 183-189 (2015).

14. Ritsma L, Steller EJA, Beerling E, et al. (2012) Intravital Microscopy Through an Abdominal Imaging Window Reveals a Pre-Micrometastasis Stage During Liver Metastasis. *Sci Transl Med* 4:158ra145-158ra145.

15. Ritsma L, Steller EJ a, Ellenbroek SIJ, et al. (2013) Surgical implantation of an abdominal imaging window for intravital microscopy. *Nat Protoc* 8:583-94. doi: 10.1038/nprot.2013.026

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.

In order to obtain organs and isolated cells for *ex vivo* analysis the mice must first be 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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2016.II.524.017
2. Titel van het project : Neutrophil subsets in health and disease
3. Titel van de NTS : Neutrofielen subtypes in gezondheid en ziekte

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: 11-08-2016
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 24-08-2016 en 21-09-2016
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 29-08-2016/18-09-2016
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 05-10-2016

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: 29-08-2016
- Datum antwoord: 18-09-2016
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.2 Doel: De DEC zou graag iets meer informatie zien over het onderzoek naar microplastics en de relevantie hiervan. Graag toevoegen.

In het projectvoorstel is meer informatie toegevoegd over de relevantie van microplastics.

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters, interventies: De DEC verzoekt u de modellen en de interventies -met name punt c, d en e- gedetailleerder te beschrijven. Wanneer kiest u voor welk model en waarom gebruikt u het auto-immuunmodel? De bijlage is nu te algemeen beschreven, waardoor het voor de DEC nu niet mogelijk om een oordeel te geven over de haalbaarheid van de studie en derhalve een advies te geven.

Graag aanpassen.

Het auto-immuunmodel en de punten c, d en e staan niet beschreven in de juiste versie van de appendix. Aangezien we de neutrofielen in de verschillende modellen willen vergelijken is er geen sprake van een keuze tussen de modellen. Waarom de keuze voor deze modellen (7) zijn gemaakt hebben we nu beter beschreven in blauwe tekst. Tevens was de rationale van de interventies (5) al beter onderbouwd in de juiste versie na tips van de IVD. Om de haalbaarheid van de studie beter te kunnen beoordelen hebben we ook een aantal voorbeelden gegeven hoe de inflammatoire modellen en interventies kunnen leiden tot de beoogde milestones genoemd in ons projectvoorstel (groene tekst).

- B. De dieren: U spreekt over geselecteerde condities en organen, maar beschrijft niet hoe deze geselecteerd worden. Graag alsnog doen.

In de bijlage is bij sectie 2A (eerste alinea) beter beschreven hoe de condities en organen geselecteerd worden.

- B. De dieren: De berekening van het aantal dieren is voor de DEC niet navolgbaar. De DEC verzoekt u dit explicieter uit te schrijven.

Dit is gewijzigd in 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. Het project richt zich op het verkrijgen van meer fundamentele kennis over de oorsprong, timing, lokalisatie en functie van neutrofielen bij inflammatoire aandoeningen. Neutrofielen zijn de meest voorkomende afweercellen in het bloed en daarmee belangrijke bestrijders van ziekteverwekkers. Het komt echter voor dat neutrofielen te heftig reageren op een ontsteking waardoor gezond weefsel beschadigd wordt. Het is daarom van belang dat neutrofielen geremd worden wanneer dit het geval is. Recentelijk zijn er twee nieuwe subtypen neutrofielen ontdekt. Eén subtype kan bacteriën beter doden dan 'gewone' in het bloed voorkomende neutrofielen en één subtype kan het afweersysteem juist onderdrukken. Onbekend is echter wanneer en waarom deze neutrofielen opgeroepen worden, waar ze vandaan komen en hoe lang ze leven. Meer kennis over deze subtypen neutrofielen kan in de toekomst ten gunste komen van therapieën voor ontstekingsgerelateerde ziekten, kanker, allergie, cardiovasculaire aandoeningen en bepaalde auto-immuunziekten. Daarnaast wordt ingezoomd op het effect van microplastics op neutrofielen. Microplastics komen voor in de gehele voedselketen en belanden zo in het menselijk lichaam. Neutrofielen komen de microplastics als eerste tegen in het menselijk lichaam, maar onbekend is of microplastics van invloed zijn op de neutrofielen en de gezondheid van de mens. Het geformuleerde doel is opgedeeld in 8 onderzoeksvragen en 11 'mijlpalen/subdoelen'. De strategie is erop gericht om ex vivo humane experimenten te combineren met in en ex vivo experimenten uitgevoerd in muizen. De uitleesparameters zijn helder en de werkwijze voor het verkrijgen van deze parameters zijn hetzelfde, maar de inflammatoire stimulus zal per experiment verschillen. Op deze manier kunnen de oorsprong, timing, lokalisatie en functie van neutrofielen tussen de verschillende inflammatoire aandoeningen vergeleken worden. De relatie tussen het hoofddoel en de subdoelen is daarmee helder en vergelijkbaar met voorbeeld 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 doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het verkrijgen van meer fundamentele kennis over de oorsprong, timing, lokalisatie en functie van neutrofielen bij inflammatoire aandoeningen. Naast effecten van bacteriële componenten op neutrofielen zomen de onderzoekers ook in op microplastics. Het uiteindelijke doel van het project is het verbeteren van therapieën bij ontstekingsgerelateerde ziekten. Om een juiste therapie te ontwikkelen of te verbeteren is het van belang de werking van het afweersysteem zo goed mogelijk te doorgronden en te begrijpen. In dit project betreft het fundamenteel onderzoek naar neutrofielen, de meest

voorkomende afweercellen in het bloed, die een cruciale rol spelen bij inflammatoire aandoeningen. 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 fundamentele onderzoeksproject naar het verkrijgen van meer kennis over neutrofielen zijn: de proefdieren, de patiënten met inflammatoire aandoeningen, de volksgezondheid, en onderzoekers. De morele waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: gezondheid, stress, natuurlijk gedrag, intrinsieke waarde en integriteit. De morele waarden die voor patiënten met inflammatoire aandoeningen worden bevorderd zijn: kwaliteit van leven en de beschikbaarheid van een juiste therapie. De morele waarden die voor de volksgezondheid bevorderd worden: meer duidelijkheid over het eventuele gevaar van microplastics voor de gezondheid en bevordering van de algehele gezondheid/gezondere voedselketen. En tenslotte de morele waarden die voor onderzoekers worden bevorderd zijn: wetenschappelijke 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 DEC is van mening dat het projectvoorstel aansluit bij recente inzichten en dat het geen belangrijke hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten beperken. De onderzoeksgroep heeft in de afgelopen jaren veel expertise opgebouwd op het gebied van in vivo beeldvormingstechnieken. Daarnaast werkt de groep samen met andere onderzoeksgroepen, deskundigen binnen het TA-COAST consortium en de kliniek. Tevens is de onderzoeksgroep opgenomen in het Laboratory for Translational Immunology, waardoor de groep kan beschikken over high-end technieken. Dit alles draagt bij aan de haalbaarheid 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. In dit project zullen humane in vitro studies gecombineerd worden met in vivo en ex vivo muizenstudies. Om de subdoelen te behalen zullen acute en chronische inflammatie modellen gebruikt worden. Deze modellen zijn helder uiteengezet, waarbij per model is aangegeven: de wijze waarop de inflammatie wordt aangebracht, de read out parameter, de experimentele groepen het aantal benodigde dieren, het te verwachten ongerief, de duur, etc. En ook de mogelijke interventies, die nodig zijn om de rol van de afzonderlijke componenten van de inflammatie te lokaliseren, zijn helder weergegeven.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buit instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. De muizen met een *imaging window* worden individueel gehuisvest om te voorkomen dat andere muizen bijten of de *imaging window* beschadigen. Met het oog op toenemend ongerief als gevolg van bijten en 'verspilling' van dieren als gevolg van een beschadigde *imaging window* is de DEC het eens met de solitaire huisvesting.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief is afhankelijk van het te gebruiken diermodel, de uitleesparameter en de interventie. Het cumulatieve ongerief wordt door de onderzoeker voor ca. 10% als licht ingeschat en voor ca. 90% als matig.
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek, mentaal en gedragsmatig aangetast. Door het toebrengen van een ontsteking zullen de dieren pijn, stress en/of ziekte ervaren (fysieke aantasting) en bij een aantal dieren wordt onder anesthesie (mentale aantasting) een *imaging window* aangebracht (fysieke aantasting). De dieren met een *imaging window* worden bovendien solitair gehuisvest. Hierdoor wordt de dieren de mogelijkheid ontnomen op bepaalde aspecten van hun natuurlijk gedrag uit te oefenen (gedragsmatige aantasting).
13. De humane eindpunten is voor de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. De experimenten zijn zodanig opgezet dat verwacht wordt dat het aantal dieren dat een humaan eindpunt bereikt tot een minimum beperkt zal blijven. Alle benodigde gegevens zullen verkregen worden voordat de dieren met tumor, een infectie of een allergie meer ongerief ondervinden. Hiertoe zullen alle dieren nauwkeurig gemonitord worden. Naast de model-specifieke parameters wordt een beoordelingschema gebruikt om op basis van de klinische kenmerken de mate van ziekte te

scoren. De DEC is derhalve van mening dat de onderzoeker tijdig kan ingrijpen indien onverwacht toch een humaan eindpunt bereikt wordt.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Voorafgaand aan het onderzoek zal in vitro onderzoek met humane cellen plaatsvinden. Het is echter niet mogelijk om met alleen in vitro onderzoek de doelstellingen van het project te behalen. Het immuunsysteem is zeer complex en veelzijdig: het beenberg, de milt, de endotheelwand en het ontstoken weefsel zijn allemaal van invloed op het immuunsysteem. Los van elkaar kan het effect in vitro onderzocht worden, maar het is niet mogelijk om de interactie te bestuderen. Hiervoor zijn diermodellen noodzakelijk. Afhankelijk van de uitkomsten van de in vitro experimenten wordt bepaald welke dierproeven zullen worden uitgevoerd.
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 en op basis van de literatuur is bepaald welke groepsgrootte nodig is om statistisch significante verschillen tussen groepen te kunnen detecteren. Het onderzoek wordt blind en gerandomiseerd uitgevoerd om bias zo goed mogelijk te voorkomen. Bij een aantal dieren wordt een *imaging window* aangebracht, waardoor het dier meerdere keren geimaged kan worden op verschillende tijdstippen. Dit heeft als voordeel dat niet voor elk tijdstip nieuwe muizen nodig zijn en dat de variatie tussen de verschillende metingen kleiner is. Daardoor wordt het aantal benodigde muizen sterk gereduceerd.' De experimenten worden sequentieel uitgevoerd met heldere go/no go momenten. Deze go/no go momenten zorgen ervoor dat het minimum aantal dieren per groep gebruikt zal worden.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De dieren worden goed gemonitord om ongerief tijdig te kunnen vaststellen en onnodig lijden te voorkomen. De experimenten worden uitgevoerd door goed getrainde biomedici/onderzoekers en er wordt adequate pre- en post operatieve pijnstilling toegepast. De DEC is van mening dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het mogelijke ongerief te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. In principe zullen dieren van beide geslachten in gelijke mate worden ingezet. De immunrespons bij mannen en vrouwen kan echter sterk verschillen. Om een bias te voorkomen zullen vooraf pilots worden uitgevoerd om te zien of dit ook in de toe te passen

modellen in muizen het geval is. Indien er te sterke verschillen optreden gaat de voorkeur uit naar het gebruik van één sekse, zodat betrouwbare vergelijkingen kunnen worden gemaakt tussen experimentele groepen. Daarnaast worden voor het spontane borstkanker model, logischerwijs, alleen vrouwelijke dieren ingezet.

19. De dieren worden in het kader van het project gedood, omdat de doelstelling van het project alleen behaald kan worden met behulp van uitgebreide analyses van de organen en cellen. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de richtlijn, passende 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 verkrijgen van meer fundamentele kennis over de oorsprong, timing, lokalisatie en functie van neutrofielen bij inflammatoire aandoeningen) en het uiteindelijke doel (het verbeteren van therapieën voor ontstekingsgerelateerde ziekten, kanker, allergie en cardiovasculaire aandoeningen en bepaalde auto-immuunziekten), gezien de hoge waarschijnlijkheid dat de directe doelstellingen behaald worden, het lichte tot matige ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project?
2. Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: matig nadeel. Waarden die voor de samenleving wordt bevorderd: matig voordeel. Waarden die voor patiënten worden bevorderd: matig voordeel bij het directe doel, maar veel voordeel bij het uiteindelijke doel. Waarden die voor de onderzoekers worden bevorderd: gering voordeel. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten en de volksgezondheid in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Het feit dat de waarden voor de onderzoekers 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 bijdragen aan de kennis omtrent de rol en het gedrag van neutrofielen bij inflammatoire aandoeningen en het effect van microplastics op neutrofielen. De patiënt zou erbij gebaat zijn wanneer met behulp van deze kennis nieuwe/betere therapieën ontwikkeld kunnen worden. De volksgezondheid zou erbij gebaat zijn als duidelijk wordt of microplastics in onze voedselketen effect hebben op de neutrofielen. Als blijkt dat deze een schadelijk effect hebben, dan nemen de bevorderende waarden toe naar 'veel voordeel'. Het is aannemelijk dat de doelstellingen

behaald zullen worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen er alles aan om het ongerief voor de dieren tot een minimum te beperken.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het verkrijgen van meer fundamentele kennis over de oorsprong, timing, lokalisatie en functie van neutrofielen bij inflammatoire aandoeningen, met als uiteindelijke doel het verbeteren van therapieën voor ontstekingsgerelateerde ziekten.

De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. 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. De DEC is er verder van 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. Met name het toepassen van de *imaging window* en het toepassen van go/no go momenten zijn van belang voor het verminderen van het aantal benodigde dieren. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstellingen opweegt tegen het lichte tot matige 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. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



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 | Neutrofielen subtypes in gezondheid en ziekte
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Neutrofiel, inflammatie, kanker, microplastics

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)
- Het afweersysteem is van levensbelang om ziekteverwekkers, kanker en ander niet-lichaamseigen materiaal te bedwingen. Bij een infectie moeten afweercellen (witte bloedcellen) opgeroepen en aangezet worden om ziekteverwekkers te bestrijden en zo het lichaam te beschermen. Neutrofielen zijn de meest voorkomende afweercellen in het bloed en zijn als eerste ter plekke bij de infectie of ontsteking. Maar soms schieten de neutrofielen door. Ze reageren dan te hevig op de infectie, met als gevolg dat de neutrofielen gezond weefsel beschadigen. Zo kunnen de neutrofielen zelfs meer schade aanrichten dan de ziekteverwekker zelf. Het is dus van groot belang dat neutrofielen uitgezet worden wanneer ze niet meer nodig zijn. Recentelijk zijn er twee extra subtypen neutrofielen gevonden. Eentje die beter bacteriën kunnen doden dan de 'gewone' in het bloed en een andere die de afweer juist kunnen onderdrukken. Als we begrijpen wanneer deze

neutrofielen opgeroepen worden, waar ze vandaan komen en hoe lang ze leven kunnen we dit in de toekomst gebruiken voor therapie. Dan kunnen we bijvoorbeeld de onderdrukkers sturen als de schade uit de hand dreigt te lopen of de goede bacteriedoders inzetten als er een systemische infectie (sepsis) is.

Ook willen we de rol van neutrofielen (subtypen) bij uitzaaiingen van kanker bestuderen. Er is namelijk een positief verband tussen het aantal neutrofielen en tumorprogressie.

Een andere deelvraag is hoe neutrofielen reageren op microplastics. Dit zijn microscopisch kleine stukjes plastic (kleiner dan 1 micrometer) die tegenwoordig veelvuldig in het milieu en onze voedselketen terechtkomen. Er wordt nog erg weinig onderzoek gedaan naar de invloed van microplastics op de gezondheid en neutrofielen zijn waarschijnlijk de afweercellen die deze plastics als eerste tegenkomen in ons lichaam.

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

Met dit project willen wij het grondwerk leggen voor de ontwikkeling van nieuwe therapieën om doorgeslagen afweerreacties te dempen of juist een zwak afweersysteem te helpen bacteriën te overwinnen. Tevens willen we bestuderen of en hoe neutrofielen tumorprogressie bewerkstelligen. Tenslotte willen we vaststellen of microplastics, die steeds meer in het milieu en onze voedselketen terechtkomen, een negatief effect hebben op de functie van de neutrofiel.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

In dit project zullen muizen als proefdier gebruikt worden. Aantallen: max. 2850 muizen gedurende 5 jaar

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

Kortdurend licht tot matig ongerief als gevolg van het toedienen van stoffen, bijvoorbeeld via injecties (niet door de gevolgen hiervan) en in een aantal gevallen matig ongerief door operaties. Gegeven het doel van het onderzoek krijgen de muizen tumoren, infecties, ontstekingen of microplastics toegediend om de neutrofielen in deze situaties te kunnen bestuderen.

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

Een groot deel ($\pm 90\%$) van de proefdieren zal matig ongerief te verdragen krijgen en de rest licht ongerief

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Na afloop van de experimenten worden de muizen gedood om de organen en cellen van de muizen tot in detail 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.

Voordat we besluiten over te gaan tot proefdierstudies, doen we eerst experimenten met humane cellen uit het bloed van zowel gezonde als zieke individuen. De resultaten uit deze experimenten bepalen uiteindelijk het besluit om een dierexperiment te gaan doen. Gegevens uit klinische studies bij patiënten kunnen ook aanleiding zijn voor het uitvoeren van dierproeven. De afweerbilans in het lichaam is uitermate complex. Het samenspel tussen meerdere organen speelt hierbij een cruciale rol die we in de mens onvoldoende kunnen bestuderen omdat we de complexiteit van een menselijk lichaam nog niet in een reageerbuisje kunnen nabootsen. Ook

kunnen we bij mensen niet zomaar van alle weefsels monsters nemen.

4.2 **Vermindering**

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

Door een goede statistische onderbouwing gekoppeld aan jarenlange ervaring kunnen we wetenschappelijk verantwoorde studies uitvoeren met een minimum aantal muizen. Afhankelijk van de uitkomsten van de eerste experimenten wordt telkens tussentijds kritisch bekeken of de hypothesen aangepast moeten worden en de uitvoering van de experimenten nog steeds essentieel is. Uiteraard worden alleen door de Instantie voor Dierenwelzijn goedgekeurde experimenten uitgevoerd.

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.

In dit project maken we gebruik van muizen. We weten dat het afweersysteem van de muis lijkt op dat van de mens en dat menselijke ziektes nagebootst kunnen worden in de muis. Er is al veel informatie beschikbaar over het afweersysteem van de muis, wat ons zal helpen in ons onderzoek. Veel van de voor ons onderzoek benodigde hulpmiddelen zijn alleen beschikbaar voor muizen.

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

Gedurende het verloop van de ziektes zullen we de dieren frequent beoordelen op welbevinden en gewicht. Bij onverwacht of overmatig ongerief zullen de muizen worden gedood.

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.

The neutrophilic granulocyte is the first line of defense against invaders such as bacteria, fungi, foreign particles and aberrant cells. As the most abundant white blood cell, it continuously circulates the blood until a signal causes it to extravasate towards the tissue. In the tissue upon phagocytosis the neutrophil will exploit the content of its granules to degrade the foreign invader or cell debris. Besides pathogens

and cell debris, we will also further zoom in on one type of foreign particles that neutrophils can encounter in the human body, microplastics. These $\leq 1\mu\text{m}$ plastic particles are very prevalent in our environment (eg in our drinking water and aquatic animals via erosion from plastic litter), but research into health effects in mammals is virtually non-existent.

Neutrophils have always been described as a homogeneous population of short-lived cells. However, recent publications of our research group and others challenge this view. Our group described that neutrophils have a longer lifespan than previously thought. And whereas the population in blood in homeostasis might be homogeneous, various stimuli disturbing homeostasis lead to heterogeneity in phenotype and function. Our group showed that if healthy humans receive an LPS injection, immature, banded neutrophils appear in the blood, which are much better at killing bacteria than mature neutrophils (Leliefeld *et al.*, manuscript in preparation).

Recently, neutrophils have been described to play a role in the pathogenesis of various human diseases such as cardiovascular disease, cancer, auto-immune diseases and allergy¹⁻⁴. Linked to these conditions, several neutrophil subsets have been newly described such as low-density granulocytes, granulocytic myeloid-derived suppressor cells (G-MDSC), tumor-associated neutrophils (TAN), and hypersegmented neutrophils⁵. Although we know that homeostatic neutrophils in humans and mice behave very similar, the similarity of neutrophil subsets in humans and mice is poorly described.

In disease, neutrophils can play a beneficial but also often a detrimental role. For example, neutrophils have been described to both promote and inhibit tumor progression and metastasis⁶. They can be both pro- and anti-inflammatory⁵. At the wrong time or the wrong place, neutrophil activation and degranulation will result in overwhelming inflammation and major tissue damage. Neutrophils present in a tumor are correlated with a worse prognosis, but the mechanisms behind this correlation are unclear⁶. The ability to steer neutrophil function, activation or localization from the outside would be beneficial for many diseases. The treatment of cancer would likely benefit from targeting only the pro-tumor neutrophil subset as opposed to all neutrophils. In contrast, the treatment of asthma would greatly benefit from targeting only the pro-inflammatory neutrophil subset.

But the basic knowledge on the timing, localization or even origin of neutrophil subsets is lacking, because we cannot easily sample human tissues. We know neutrophils develop in the bone marrow, but the time they need to develop is uncertain. We know neutrophils are able to migrate to lymph nodes via lymph vessels, but the signal driving them as well as their function in the lymph node are unclear. We know different subtypes of neutrophils have different functions, but when and where the differentiation of these subsets starts to diverge is again unclear.

To answer these types of questions, we need to gain a better understanding of the complex interplay of the entities that can guide the neutrophil: most importantly the bone marrow, spleen, endothelium, inflamed tissue, tumor cells, foreign particles, other immune cells and the neutrophil itself. As well, we think it is important to understand whether neutrophil subsets observed upon inflammation are the same throughout the range of inflammatory disorders. If they have a different phenotype and/or function for different types of disorders, that would be highly relevant for designing new therapies.

Understanding how and where the different neutrophil subsets arise in inflammatory conditions and what mechanisms underlie their function is essential to determine their role in disease and to establish potential treatment options. Redirection of immune responses has an enormous societal and scientific relevance as inflammation-associated diseases (including cardiovascular disease, cancer, auto-immunity and allergy) are associated with major pathology and morbidity.

In this research project we will combine data of healthy mice, mice with acute inflammation and mice with chronic inflammation, to help us understand why and when different neutrophil subsets are developed and recruited. Even if murine neutrophil subsets do not resemble those in human, this data will together show whether the response of the neutrophil to inflammation is generic, or tailored to the stimulus. Examples of inflammatory stimuli are pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), damage-associated molecular patterns (DAMPs) and tumor antigens. At the same time, we will have a better idea whether inhibiting or stimulating neutrophils in these specific conditions would be beneficial or detrimental to the disease progression.

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 gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and

function of neutrophils in inflammatory conditions. These research questions will therefore be addressed:

- Is the neutrophil population heterogeneous in morphology?
- Is the neutrophil population heterogeneous in function?
- Does the migration & distribution of neutrophils throughout the body depend on the type of inflammatory stimulus?
- Does the differentiation of neutrophils depend on the type of inflammatory stimulus or organ?
- Does the function of neutrophils depend on the type of inflammatory stimulus?
- Does the life-span of neutrophils depend on the type of inflammatory stimulus?
- Does the interaction of neutrophils differ per type of inflammatory stimulus?
- Does the phagocytosis of microplastics influence neutrophil function?

From human data, we know that heterogeneous neutrophil subsets appear in the blood upon strong immune stimulation such as LPS injection, cancer, trauma or viral infection. However, these different conditions make the subsets appear in the circulation at a different timing. Our preliminary data shows neutrophil heterogeneity is also induced in mice upon trauma (acute inflammation) or solid tumor growth (chronic inflammation).

In healthy mice, mice with acute inflammation and mice with chronic inflammation, we will analyze the phenotype and function of the neutrophils *ex vivo*, crucially supported by analysis of the kinetics of murine neutrophils *in vivo*. *Ex vivo* analysis is aided by our longstanding experience with flow cytometry and assays on neutrophil function (migration, phagocytosis, ROS formation, degranulation, etc., etc.). In the kinetics studies we will study the distribution of neutrophils by *ex vivo* analysis of the neutrophils in different organs, as well as the migration of neutrophils by intravital imaging. In these intravital imaging experiments, neutrophil migration is easily tracked in mice that produce fluorescent neutrophils such as the LysM-GFP or the Catchup^{IVM} mouse^{7, 8}.

There are several other reasons why we are confident that we can achieve our aims: Our group is embedded in the Laboratory of Translational Immunology (LTI), which is a center-of-excellence on fundamental and translational immunological research. Since the clinic is very close and our medical PhD students closely collaborate with clinical doctors, we can obtain patient material for research. The complementary use of patient material and well-defined animal models will ensure the successful completion of this project. The LTI provides core facilities for various high-end techniques such as histology, fluorescent confocal imaging, intravital imaging and flow cytometry. Moreover, the animal facility offers dedicated staff providing the regular housing of the animals and support and counsels the scientist in their experiments. Within our group, only trained and experienced people perform experiments.

Our research and experiments are constantly evaluated within our group, and by various other groups within our institute and campus. To aid our research on microplastics, we collaborate with experts from different fields in the TA-COAST consortium. Over the last few years, we have built up a repertoire of state-of-the-art *in vivo* imaging techniques to study immune cells in living mice. This has led to many new discoveries and breakthroughs published in scientific journals⁹⁻¹⁵. Our research is funded by major funding agencies. Our embedding in an excellent scientific environment, our unique techniques and approaches, and our previous achievements make it very likely that with the experiments described in this project we will make large contributions to our main research questions.

3.3 Relevance

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

The enormous burden of inflammation-associated diseases (including cardiovascular disease, cancer, auto-immunity and allergy) worldwide is aggravated by lack of adequate treatment options. This is due to insufficient knowledge about the common player in virtually all inflammatory processes: the neutrophil. The burden of neutrophil-mediated pathology is high, but no specific therapy is currently available. The estimated costs to society (EU) are now above 250 billion euros annually, which will only rise in the future¹⁶. Recent insights show that the neutrophil can be both pro- and anti-inflammatory⁵. Inhibition of pro-inflammatory neutrophils and activation of anti-inflammatory neutrophils will be beneficial for patients in pro-inflammatory states, whereas patients with a suppressed immune system such as in cancer or after acute severe inflammation may profit from a reverse approach. The lack of knowledge regarding this emerging concept has to date precluded the development and translation of the manipulation of neutrophils into a clinical application. Successful manipulation of the different neutrophil subsets will be widely applicable to a range of different inflammatory diseases.

Pollution of the water environment with microplastics by erosion of plastic litter is a pressing problem that has received a lot of attention in the last few years. It has been shown that microplastics end up in

our food chain, but their effects on human health are currently understudied. To assess their effects on human health we look at neutrophils, since they are specialized in taking up foreign particles. Our preliminary human *in vitro* data shows that neutrophils are also able to engulf microplastics. These microplastics are likely not degraded by the neutrophils and might have an effect on their survival and their capacity to subsequently kill pathogens. If we demonstrate that microplastics adversely affect human health, evidence-based regulatory measures can be formulated.

3.4 Research strategy

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

The strategy of this project is to combine human *in vitro* experiments with murine *ex vivo* and *in vivo* experiments. The readout of each animal experiment will consist of some or all of the following:

- descriptive data on single cell level (flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.)
- functional data (on specific functions of the neutrophil such as migration, phagocytosis, etc)
- intravital microscopy data
- descriptive data on disease progression (e.g. weight loss, microbial load, tumor size).

The methods for obtaining these readout parameters will be the same for all experiments in this proposal, but the inflammatory stimulus will differ per experiment. We think the combination of several inflammatory stimuli is the strength of this project, because currently it is unknown whether neutrophils respond the same to diverse inflammatory signals (e.g. PAMPs, DAMPs, tumor antigens).

Supported by our own research on human material, pigs and mice, we have a number of hypotheses that we will start with. However, since our research is mostly fundamental and novel, we cannot know whether these hypotheses will prove correct. In the next five years, human data will be combined with data from the animal experiments to adapt our hypotheses when necessary.

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.

Firstly, we want to investigate whether the morphology and function of murine neutrophil subsets is similar to the subsets we described in humans (¹⁷, Tak *et al.* submitted, Leliefeld *et al.* manuscript in preparation). Therefore we will start with an experiment of LPS injection in mice similar to our experiments with LPS injection in humans. But to extend our findings to more physiological inflammatory stimuli, we want to use bacterial infection, viral infection, plastic particles or sterile injury. To look at stimuli specific for chronic inflammation, we want to use animals with solid tumor growth or airway allergy, two relevant diseases with a significant but opposite role for neutrophils. Homeostatic neutrophils will be analyzed *ex vivo* and *in vivo* and compared to the neutrophils arising in an inflammatory state. As described in 3.1, neutrophil behavior is determined by a complex interplay of the bone marrow, spleen, endothelium, inflamed tissue, tumor cells, foreign particles, other immune cells and the neutrophil itself. To study this system, we want to modify these entities one by one. Therefore we will perform one or more of the following interventions in these mice:

- **A:** Administration of drugs/antibodies/inhibitors/labels
We might be able to rescue or mimic the phenotypes of the neutrophil subsets and therefore further identify the function of these cells *in vivo*. If possible and/or relevant, we will always test these compounds first *in vitro* and in case relevant effects are observed shift to in the *in vivo* experiments. Other examples include *in vivo* antibody administration, injection of fluorescent compounds for short term labeling of blood vessels, transfer of labelled erythrocytes to long-term label blood vessels, injection of propidium iodide to monitor cell death, injection of Hoechst to stain nuclei, administration of compounds which incorporate into DNA to measure cell life span and proliferation such as deuterated water, deuterated glucose, EdU or BrdU.
- **B:** Adoptive transfer
To study human cells *in vivo* or to, for instance, compare wildtype neutrophils with neutrophils that have a mutation we need to adoptively transfer donor neutrophils into recipient mice. Irradiation of recipient mice to deplete their endogenous immune system might be required. Also (fluorescently) labeled cells might be transferred for tracking purposes.
- **C:** Bone marrow scaffold
To study neutrophil progenitors and differentiation. Intravital imaging of the bone marrow compartment is hard due to the solid thick nature of the surrounding bone. In a pilot study we have successfully placed an imaging window on a subcutaneous bone marrow scaffold [Groen Blood 2012] allowing the visualization of cells in the bone marrow.
- **D:** Splenectomy
To study neutrophil [redacted] and [redacted] in the spleen. Literature as well as our

preliminary data suggests that [REDACTED]. Additionally, [REDACTED] with [REDACTED], especially [REDACTED], may [REDACTED]. To study how these subtypes or cell-cell interactions affect the immune system as a whole, we are interested in applying our inflammatory stimuli in splenectomized animals.

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.

For most experiments we first consider *ex vivo* experiments (mild discomfort), before we consider intravital imaging experiments (mild to moderate discomfort). In some experiments we first consider intravital imaging, either because some questions can only be answered by imaging the same tissue over multiple imaging sessions, or because it significantly reduces the number of required mice (can be up to a reduction of 20x); multiple time points can be measured in one individual, and there is no inter-mice variation. After completion of the intravital imaging experiments, cells, tissues and organs will be isolated and analyzed to reduce the number of mice required. For using the different inflammatory stimuli mentioned under 3.4.2, the experiments for optimization and set-up will be the same.

Milestones:

- i. Phenotypic definition of neutrophil subsets (surface marker expression, nuclear morphology, etc.)
- ii. Functional definition of neutrophil subsets (better/worse in killing, pro- or anti-inflammatory, etc.)

*Go/no-go moment: When we do not find distinct subsets in the mouse but a homogenous neutrophil population, this milestone will not be pursued:

- iii. To know where [REDACTED]

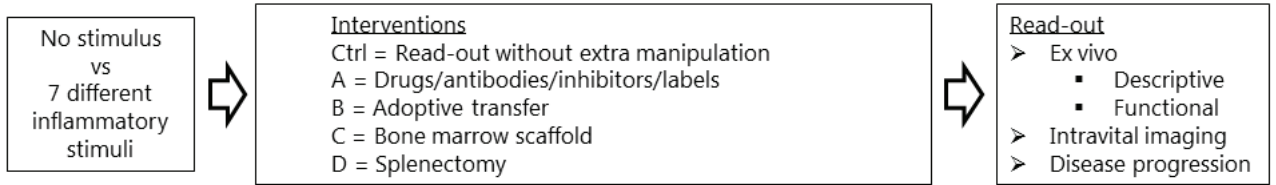
But these milestones below are independent of the go/no-go moment:

- iv. To know whether phenotype and function of neutrophils is the same throughout a range of inflammatory disorders
- v. To know whether the interaction between the neutrophils and the inflammatory stimulus is the same throughout a range of inflammatory disorders
- vi. To know the distribution pattern of neutrophils/neutrophil subsets after leaving the bone marrow, in homeostasis vs. inflammatory conditions
- vii. To know the life-span of murine neutrophils/neutrophil subsets, in homeostasis vs. inflammatory conditions
- viii. To confirm whether neutrophils/neutrophil subsets continue migrating towards other organs after phagocytosis of pathogens in infected tissue
- ix. To confirm whether the [REDACTED]
- x. To know whether inhibition of neutrophils/neutrophil subsets can relieve symptoms in allergic airway disease
- xi. To know whether inhibition of neutrophils/neutrophil subsets has an effect on tumor growth

These milestones can be reached simultaneously and do not depend on each other. When we do not reach the first three milestones, i.e. when we do not find distinct subsets in the mouse but a homogenous neutrophil population, then the latter milestones remain valuable for this homogenous neutrophil population.

To further clarify how different inflammatory stimuli will be combined with the interventions described in 3.4.2 to reach these milestones, we provided Scheme 1.

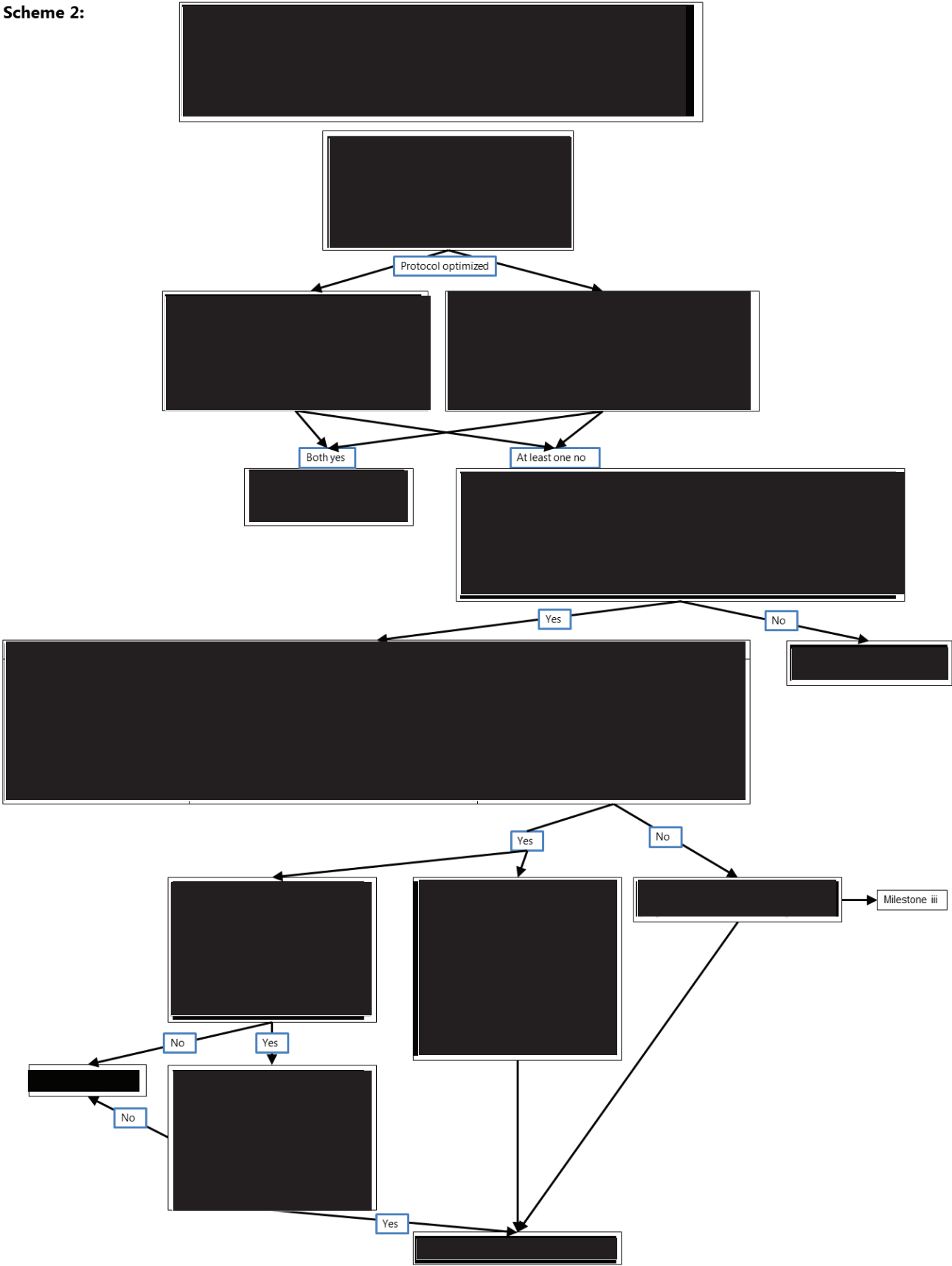
Scheme 1:
Combinations of inflammatory stimuli – interventions – milestones



Ctrl	A	B	C	D	Milestone	Discomfort
√					i-xi	Mild/Mod
	√				i-xi	Mild/Mod
		√			ii-xi	Mild/Mod
			√		iii-vi, viii	Moderate
				√	ix	Moderate
	√	√			ii-xi	Moderate
	√		√		iii-vi, viii, ix	Moderate
		√	√		iii-vi, viii	Moderate
	√	√	√		iii-vi, viii	Moderate
	√			√	ix	Moderate
		√		√	ix	Moderate
	√	√		√	ix	Moderate
			√	√	ix	Moderate

For more technical details on the procedures, we refer to the appendices. To further clarify how typical experiments within this project would be performed, we have chosen to elaborate on the approach of milestone ix in detail. In Scheme 2 we listed the experiments that will be performed to reach this milestone.

Scheme 2:



References

1. Maskrey, B. H., Megson, I. L., Whitfield, P. D. & Rossi, A. G. Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 1001-1006 (2011).
2. Moses, K. & Brandau, S. Human neutrophils: Their role in cancer and relation to myeloid-derived suppressor cells. *Semin. Immunol.* **28**, 187-196 (2016).
3. Kaplan, M. J. Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Res. Ther.* **15**, 219 (2013).
4. Bruijnzeel, P. L., Uddin, M. & Koenderman, L. Targeting neutrophilic inflammation in severe neutrophilic asthma: can we target the disease-relevant neutrophil phenotype? *J. Leukoc. Biol.* **98**, 549-556 (2015).
5. Pillay, J., Tak, T., Kamp, V. M. & Koenderman, L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell Mol. Life Sci.* **70**, 3813-3827 (2013).
6. Uribe-Querol, E. & Rosales, C. Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin. *J. Immunol. Res.* **2015**, 983698 (2015).
7. Hasenberg, A. et al. Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nat. Methods* **12**, 445-452 (2015).
8. Peters, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* **321**, 970-974 (2008).
9. Beerling, E., Ritsma, L., Vrisekoop, N., Derksen, P. W. & van Rheenen, J. Intravital microscopy: new insights into metastasis of tumors. *J. Cell. Sci.* **124**, 299-310 (2011).
10. Ritsma, L., Vrisekoop, N. & van Rheenen, J. In vivo imaging and histochemistry are combined in the cryosection labelling and intravital microscopy technique. *Nat. Commun.* **4**, 2366 (2013).
11. Torabi-Parizi, P. et al. Pathogen-related differences in the abundance of presented antigen are reflected in CD4+ T cell dynamic behavior and effector function in the lung. *J. Immunol.* **192**, 1651-1660 (2014).
12. van Golen, R. F. et al. The mechanisms and physiological relevance of glycocalyx degradation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Antioxid. Redox Signal.* **21**, 1098-1118 (2014).
13. Ritsma, L. et al. Intravital microscopy through an abdominal imaging window reveals a pre-micrometastasis stage during liver metastasis. *Sci. Transl. Med.* **4**, 158ra145 (2012).
14. Zomer, A. et al. Intravital imaging of cancer stem cell plasticity in mammary tumors. *Stem Cells* **31**, 602-606 (2013).
15. Beerling, E. et al. Plasticity between Epithelial and Mesenchymal States Unlinks EMT from Metastasis-Enhancing Stem Cell Capacity. *Cell. Rep.* **14**, 2281-2288 (2016).
16. Gibson, G. J., Loddenkemper, R., Lundback, B. & Sibille, Y. Respiratory health and disease in Europe: the new European Lung White Book. *Eur. Respir. J.* **42**, 559-563 (2013).
17. Pillay, J. et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J. Clin. Invest.* **122**, 327-336 (2012).

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	Intervention A: Compound administration
2	Intervention B: Adoptive transfer
3	Intervention C: Bone marrow scaffold
4	Intervention D: Splenectomy
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'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 1	Type of animal procedure Compound administration

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.

The objective of this project is to gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and function of neutrophils in diverse inflammatory conditions. To achieve this, we need to administer compounds to

- Visualize our cells of interest
- Measure cell death, proliferation and lifespan
- Inhibit, stimulate, deplete or mimic components of the inflammatory reaction

The readout of each animal experiment will consist of some or all of the following:

- descriptive data on single cell level (flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.)
- functional data (on specific functions of the neutrophil such as migration, phagocytosis, etc)
- intravital microscopy data
- descriptive data on disease progression (e.g. weight loss, microbial load, tumor size).

The methods for obtaining these readout parameters will be the same for all experiments, but the inflammatory stimulus will differ per experiment. The purpose of our experiments is to compare the neutrophil populations between all the different inflammatory conditions.

Ex vivo analysis:

In order to study the origin and kinetics of the neutrophil populations we need to investigate the different relevant organs. Neutrophils develop in the bone marrow and occasionally the spleen and subsequently migrate through the blood to the inflammatory site. In addition, neutrophils are thought to reside in the lungs and liver (marginated pool). All these organs are therefore relevant for our studies. Whenever we will perform animal experiments we will therefore harvest multiple organs for our analysis.

After the different interventions, tissues can be isolated and analyzed with microscopy. In addition cells can be isolated from the different tissues for further descriptive analysis (e.g. FACS of cell surface

expression) and/or for functional assays (e.g. survival assay, bacterial killing capacity, T cell suppression capacity).

This *ex vivo* analysis will allow us to link surface markers between human and mouse neutrophils. Surface marker expression and nuclear morphology allow us to distinguish different neutrophil subsets in mice, in multiple organs. We can see whether the different inflammatory conditions recruit the subsets with similar dynamics. Lastly, using functional *in vitro* assays we can investigate whether the subsets differ in their capacity e.g. to kill microbes and suppress T cell proliferation like we found in humans.

Intravital imaging:

Two different strategies will be used for the imaging experiments: (1) Imaging in an acute experiment under anesthesia and (2) implanting an imaging window (such as on the breast, skin, abdomen and skull) and repeatedly image through that window. For long-term studies the animal needs to be imaged by multiple imaging sessions, and therefore imaging windows are required. From experience we know that the implantation of intracutaneous windows does not lead to post-operative discomfort.

For some research questions, the tissue needs to be visualized frequently for a relative short-period of time (up to max 2 days). It is ethically undesirable to anesthetize the animal multiple times a day, so the animal will be constantly anesthetized. We have a lot of experience in the lab with these procedures, and only well trained researchers will perform these experiments. We have observed homeostatic neutrophils respond normally to stimuli under the conditions of these experiments.

In vivo imaging will allow us to study dynamic processes that are missed in static analysis. Imaging windows allow us to image the same mouse repeatedly over time as opposed to analyzing separate mice at different timepoints, greatly reducing the amount of animals needed. Additionally, this provides paired data, introducing less variation and therefore fewer animals are needed to get statistically significant results.

At the end point of intravital microscopy, tissues will always be analyzed *ex vivo* to reduce the number of mice required.

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

Below the experimental approach per inflammatory stimulus and the intervention will be described. The choices about mice strains and numbers are further explained in B.

1. Inflammatory stimulus: LPS injection

Justification: LPS is a relatively simple model for acute inflammation with which we have a lot of experience *in vivo* in humans. It is in this model where we first described the different neutrophil subsets.

Description: Mice receive a single bolus of E. coli lipopolysaccharide intravenously (i.v.).

Mice: wildtype or intravital imaging strains

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours-days

Level of discomfort: mild or moderate

2. Inflammatory stimulus: Bacterial infection

Justification: Bacterial infection is a more complex, but more physiological relevant model for acute inflammation with which we have a lot of experience *in vitro* in humans.

Description: Mice are infected with (fluorescent) staphylococci via intradermal or intraperitoneal injection as described before^{1, 2}.

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – 2 weeks

Level of discomfort: moderate

3. Inflammatory stimulus: Viral infection

Justification: Viral infection is a complex physiological relevant model for inflammation with which we have some experience *in vitro* in humans.

Description: Mice are infected with influenza virus or rhinovirus 16 via intranasal administration, as performed before (Suzanne Bal, personal communication).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – 8 weeks

Level of discomfort: moderate

4. Inflammatory stimulus: Plastic particles

Justification: The effects of microplastics on human health are currently understudied. We have found neutrophils can engulf microplastics and now want to investigate their effect on neutrophil survival and function.

Description: Microplastics (plastic particles $\leq 1 \mu\text{m}$) are administered via subcutaneous injection, via addition to the drinking water, or via i.v. injection to mimic exposure routes in humans.

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – one year

Level of discomfort: mild or moderate

5. Inflammatory stimulus: Sterile injury

Justification: Sterile injury is known to recruit neutrophils without a pathogenic stimulus. Therefore this can act as a control for pathogen infection or as a model for damage-associated molecular pattern (DAMP) release.

Description: Under anesthesia, sterile injury is inflicted in the skin by needle insertion or laser damage

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours - days

Level of discomfort: mild or moderate

6. Inflammatory stimulus: Airway allergy

Justification: Allergy is a complex physiological relevant model for chronic inflammation with which we have a lot of experience in humans.

Description: Mice are sensitized and challenged with house dust mite by intranasal administration, as performed before (Suzanne Bal, personal communication).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: 2 – 8 weeks

Level of discomfort: mild or moderate

7. Inflammatory stimulus: Solid tumor growth

Justification: Cancer is a complex physiological relevant model for chronic inflammation. The suppressive neutrophil has been described in this model.

Description: We use genetic mouse models for breast or colorectal cancer, or transfer tumor cells/pieces from these mouse models to healthy mice of the same background to increase reproducibility or for intravital imaging.

Mice: Spontaneous tumor models or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – months

Level of discomfort: mild or moderate

These different inflammatory stimuli will be combined with the intervention described here and/or with interventions B/C/D, as described in the project proposal.

Intervention A: Administration of drugs/antibodies/inhibitors/labels

Description: Drugs, antibodies, small molecules, chemicals, fluorescent compounds, propidium iodide to monitor cell death, Hoechst to stain nuclei, or compounds which incorporate into DNA to measure cell life span and proliferation such as deuterated water, deuterated glucose, EdU, or BrdU are administered to mice via the appropriate route as described in literature (i.v., i.p., i.n., diet, etc).

Rationale:

- During intravital imaging different cells and structures should be distinguished.
E.g. CD62L is a surface receptor that can distinguish different neutrophil subsets. By staining CD62L using a fluorescent antibody we can visualize these different subsets *in vivo* to help achieve milestones i-iv, vi, viii and ix.
- Measure cell life span and proliferation
E.g. by deuterium incorporation into DNA of proliferating cells we can determine the lifespan of neutrophils in homeostasis vs inflammatory conditions as described in milestone iii, vii and ix.
- Inhibit, stimulate, deplete or mimic components of the inflammatory reaction.
E.g. by deleting neutrophils with anti-Ly6G antibodies we can delineate the role neutrophils play in disease progression or behavior of other cell types to accomplish milestone x and xi. The specific nature of these compounds will follow from our experimental results in the next five years.

Extra experimental groups: treated vs. not treated.

Number of mice per group: as described per inflammatory stimulus.

Duration of intervention: seconds – months, possibly repeatedly
Level of discomfort: mild or moderate

The final level of discomfort depends on the inflammatory stimulus, whether the intervention is used in combination with other interventions and the choice of the readout parameter. Harvesting of organs for *ex vivo* analysis or single session intravital imaging will result only in mild discomfort, but repeated intravital imaging will probably result in moderate discomfort.

The experimental design and the exact number of animals of each experiment is determined and described in detail in a work protocol according to the advice from the Animal Welfare Body and a statistician.

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

When possible, blinding and randomization will be used to prevent bias as much as possible. For example, videos obtained with intravital imaging can be coded by an independent colleague before image analysis by the researcher.

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$. Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based on literature and/or years of experience with similar type of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

B. The animals

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

Since for our experiments the different interventions described in the different appendices will be combined, it is difficult to pinpoint the estimated numbers per intervention. Therefore here we describe the grand total of estimated numbers for our whole project.

Species: *Mus musculus*

Origin: Common breeding facility (Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium) at Utrecht University/Hubrecht institute/external licensed breeders

Estimated numbers: max. 3000

Life stages: adults

Species

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand neutrophil development, homeostasis and response to inflammation in the context of the whole organism. For the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) physiology is more extensively characterized than other animal models; (2) a large number of relevant transgenic and knock out lines is already available; (3) a large number of relevant antibodies and other compounds is already available; (4) our research shows murine neutrophils are representative for human neutrophils; (5) many procedures for intravital imaging have already been described. The zebrafish is also an animal widely used for intravital imaging, but the differentiation of zebrafish neutrophils is much less similar to human neutrophils. Since mice are mammals too, they are closer to the human.

Mice strains used are amongst others:

- Wildtype BL/6
- Wildtype Balb/c
- Wildtype FVB
- LysM-GFP mice; for visualization of fluorescent neutrophils in intravital imaging. We are already working with this strain.
- Catchup^{IVM} mice (Ly6G-Cre + Rosa-Td-Tomato); for visualization of fluorescent neutrophils in intravital imaging and for conditional knockouts in neutrophils⁵. This strain was very recently created, we want to import this strain. If the results will be superior to LysM-GFP mice, we will switch to this strain.
- MRP/S100A8-Tg-EGFP-Cre; for conditional knockouts in neutrophil progenitors⁶. We want to

import this strain. As opposed to the Catchup^{IVM} mice, Cre recombinase is expressed in granulocyte-macrophage progenitors in the bone marrow.

- Knockout mice (e.g. CD11b-knockout mice); to investigate the role of a specific gene or protein
- Tumor models such as MMTV-PyMT, MMTV-Wnt1 or C26 colorectal cancer mice. In our currently running animal experiments we are comparing different tumor models with each other, to optimize for future experiments. Therefore we have not completely decided which tumor models we will use in the next five years, but it will be a model that is similar in execution and discomfort as the here mentioned examples.
- Humanized mice⁷ or immunocompromised mice (e.g. NSG mice); to investigate the behavior of human neutrophils in an *in vivo*-like situation.

If the required genetically modified mouse is not available, we will obtain this model by generating, importing or by crossing existing models. Other strains will be used when in the next five years, novel strains are described or created that are very relevant to our hypotheses.

Estimated numbers

Our experiments can be divided into:

- Descriptive analysis (5-15 animals x max 5 time points = max 75 animals)
- Functional assays (5-15 animals x max 5 time points = max 75 animals)
- Intravital imaging (5-10 animals)

This totals to 55-160 animals

However, we have 7 inflammatory stimuli, 4 interventions and no intervention per stimuli = 35 conditions.

So for the total we have to multiply the 55-160 animals with 35 = 1925-5600 animals

However, these numbers are overestimations because:

- Controls can be shared between experiments when these are performed simultaneously
- Descriptive single cell and functional assays will be combined when neutrophil numbers allow this
- When differences between groups turn out to be very striking, we do not need the maximum number of mice per group
- Successful pilot studies may be included in the dataset

Therefore we do not anticipate we will need more than 2500 mice for the experiments.

Additionally, a number of ca. 500 mice is needed for:

- Maintenance of breeding
- Creation of new knockout models
- Pilot studies for validation of models/techniques
- Training of new personnel or new techniques
- Rederivation of imported strains via embryo transfer
- To compensate for unforeseen loss of animals (max 10%, e.g. due to location not suitable for imaging, problems with the window)

Mice that become surplus during breeding, will be used for pilot studies and training purposes.

Together we therefore anticipate we need a grand total of 3000 mice.

Sex

In general, we will try to use both male and female mice. However, it is clear that the immune response of males and females can greatly differ⁸. Therefore, we will perform pilot studies to ensure that the sex of the animal does not pose a bias in answering the particular research question. These pilots may prove it necessary to use only one sex within one animal experiment, to be able to reliably compare experimental groups.

One clear exception is the MMTV-PyMT breast cancer model; in this model only female mice consistently develop breast tumors.

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:

Immune responses are highly complex and multifaceted. Multiple compartments such as the bone marrow, spleen, endothelial wall and inflamed tissue interact. Certain aspects of the immune response can be separately simulated *in vitro*, but it is not yet possible to study the full course of infection and the elicited immune response *in vitro*. This requires animal models. Similarly, the use of experimental interventions to test their potential beneficial impact on the course of disease can only be assessed in animal models. Clearly, such experimental interventions cannot be performed in patients, while *in vitro* studies with isolated human cells do not capture the full complexity of infection. However, before turning to mice, we will first study human cells *in vitro* to ensure we only perform the most relevant experiments in mice.

Reduction:

Intravital imaging using imaging windows allows us to image the same mouse repeatedly over time as opposed to analyzing separate mice at different timepoints greatly reducing the amount of animals needed. Additionally, this provides paired data, introducing less variation and therefore fewer animals are needed to get statistical significant results. Statistical power calculation based on our own previous experience and literature will be used to determine the optimal number of mice for each experimental group. Moreover, experiments will be performed sequentially, based on the described go/no-go decisions, via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative. Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible.

Refinement:

Except for mice with windows, where co-housing can give problems, mice will be housed in groups in cages. Nesting opportunities will always be provided. Mice with windows will be monitored at least twice a week, mice after bacterial or viral infection will be monitored at least every other day, more if necessary, for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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

As described under refinement, mice welfare will be regularly monitored. Mice reaching the humane endpoints or otherwise suffering from severe discomfort will be euthanized. New personnel will be trained to recognize discomfort in mice according to current guidelines (e.g. ⁹). Surgical exposure will be performed under aseptic conditions using sterile instruments. Heating devices will be used to ensure a stable body temperature of the mouse during anaesthesia. Personnel conducting the surgeries is first properly trained, starting with training on cadavers.

Surgical exposure will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Pre- and post-procedural analgesia will be used when indicated or when pain-related behavior is observed. However, common analgesics such as opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to significantly alter the immune response¹⁰⁻¹². Since this is our main research topic, we might sometimes refrain from using analgesia. It may be necessary to do pilot studies to prove whether analgesics pose a bias in answering our particular research question. From literature, it seems buprenorphine may be a reasonable candidate¹³.

There are no expected adverse effects on the environment.

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.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

Mice with an imaging window will be housed individually to prevent other mice from biting or damaging the window.

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Surgical exposure will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Pre- and post-procedural analgesia will be used when indicated or when pain-related behavior is observed. However, common analgesics such as opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to significantly alter the immune response¹⁰⁻¹². Since this is our main research topic, we might sometimes refrain from using analgesia. However, pain can also influence the immune system. Therefore, it may be necessary to do pilot studies to prove whether analgesics pose a bias in answering our particular research question.

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

Surgical exposure will be performed under aseptic conditions using sterile instruments. Heating devices will be used to ensure a stable body temperature of the mouse during anaesthesia. Personnel conducting the surgeries is first properly trained, starting with training on cadavers. Before, during and after surgery adequate anesthesia and analgesia (e.g. isoflurane and buprenorphine) will be used, according to experience as well as published protocols. New personnel will be trained to recognize discomfort in mice according to current guidelines (e.g. ⁹).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will consist of a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than moderate discomfort. Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. All relevant scientific data can and will be gathered *before* the cancer, infection or allergy studies reach a level of severe discomfort. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized. It is expected that no animals (0%) will be experiencing more than mild discomfort due to the genetic modification. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect.

So, in all cases, animals will be carefully monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day and analyzed when possible. Animals may lose their window (<5%). In the vast majority of these animals (>95%), we notice signs of detachment of the window far before it becomes loose, and the mice will be sacrificed. In the remaining animals, the window loss will be noticed within 24hrs and the mouse will be immediately sacrificed.

Explain why these effects may emerge.

Tumor development, inflicted inflammation, genetic alterations and administration of compounds/ drugs/ chemicals/ toxins.

It is unclear why some animals may lose their windows.

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

Mice with windows will be monitored at least twice a week, mice after bacterial or viral infection will be monitored at least every other day, more if necessary, for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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.

As described in D, F, H and I, the experiments will be set-up in such a way that the incidence of reaching the humane end-point is kept to a minimum.

Weight loss (>20% in comparison with control or original weight or 15% weight loss in two days), reaching a score of 4 on the illness scale (specified below), severe shortness of breath, or loss of window is set as an humane end point. For all tumor models the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed, taking into account e.g. the size, location and ulceration of the tumor(s).

Next to model-specific parameters, an illness grading scale will always be used to score a set of clinical features detected in mice with different degrees of illness:

0: healthy

1: barely ruffled fur

2: ruffled fur, but active

3: ruffled fur and inactive

4: ruffled fur, inactive, hunched, and gaunt

5: dead

Indicate the likely incidence.

Expected <5% and <1day.

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative level of discomfort is dependent on the intervention, the read-out and the animal model. The discomfort of these three range from mild to moderate. Therefore combinations of these result in moderate discomfort for the majority (~90%) of animals.

References for the whole appendix

1. Liese, J., Rooijackers, S. H., van Strijp, J. A., Novick, R. P. & Dustin, M. L. Intravital two-photon microscopy of host-pathogen interactions in a mouse model of Staphylococcus aureus skin abscess formation. *Cell. Microbiol.* **15**, 891-909 (2013).
2. Spaan, A. N. *et al.* The staphylococcal toxins gamma-haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nat. Commun.* **5**, 5438 (2014).
3. Groen, R. W. *et al.* Reconstructing the human hematopoietic niche in immunodeficient mice: opportunities for studying primary multiple myeloma. *Blood* **120**, e9-e16 (2012).
4. Levy, L. *et al.* Splenectomy inhibits non-small cell lung cancer growth by modulating anti-tumor adaptive and innate immune response. *Oncoimmunology* **4**, e998469 (2015).
5. Hasenberg, A. *et al.* Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nat. Methods* **12**, 445-452 (2015).
6. Lagasse, E. & Weissman, I. L. Bcl-2 Inhibits Apoptosis of Neutrophils but Not their Engulfment by Macrophages. *J. Exp. Med.* **179**, 1047-1052 (1994).

7. Coughlan, A. M., Freeley, S. J. & Robson, M. G. Animal models of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **169**, 229-237 (2012).
8. Gubbels Bupp, M. R. Sex, the aging immune system, and chronic disease. *Cell. Immunol.* **294**, 102-110 (2015).
9. Burkholder, T., Foltz, C., Karlsson, E., Linton, C. G. & Smith, J. M. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **2**, 145-165 (2012).
10. Salimi, V. *et al.* Opioid receptors control viral replication in the airways. *Crit. Care Med.* **41**, 205-214 (2013).
11. Sacerdote, P. Opioids and the immune system. *Palliat. Med.* **20 Suppl 1**, s9-15 (2006).
12. Hish, G. A., Diaz, J. A., Hawley, A. E., Myers, D. D. & Lester, P. A. Effects of Analgesic Use on Inflammation and Hematology in a Murine Model of Venous Thrombosis. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **53**, 485-493 (2014).
13. Mundt, S., Groettrup, M. & Basler, M. Analgesia in mice with experimental meningitis reduces pain without altering immune parameters. *ALTEX* **32**, 183-189 (2015).

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.

In order to obtain organs and isolated cells for *ex vivo* analysis the mice must first be 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'.	11500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		2	Adoptive transfer

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.

The objective of this project is to gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and function of neutrophils in diverse inflammatory conditions. To achieve this we need to adoptively transfer cells to:

- Visualize the migratory behavior of neutrophils and different neutrophil subsets
- Investigate whether [redacted] can [redacted] or rather that [redacted]
- Determine whether different neutrophil subsets have different functions (including bacterial killing and the inhibition of immune responses)

The readout of each animal experiment will consist of some or all of the following:

- descriptive data on single cell level (flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.)
- functional data (on specific functions of the neutrophil such as migration, phagocytosis, etc)
- intravital microscopy data
- descriptive data on disease progression (e.g. weight loss, microbial load, tumor size).

The methods for obtaining these readout parameters will be the same for all experiments in this proposal, but the inflammatory stimulus will differ per experiment. The purpose of our experiments is to compare the neutrophil populations between all the different inflammatory conditions.

Ex vivo analysis:

In order to study the origin and kinetics of the neutrophil populations we need to investigate the different relevant organs. Neutrophils develop in the bone marrow and occasionally the spleen and subsequently migrate through the blood to the inflammatory site. In addition, neutrophils are thought to reside in the lungs and liver (marginated pool). All these organs are therefore relevant for our studies. Whenever we will perform animal experiments we will therefore harvest multiple organs for our analysis.

After the different interventions, tissues can be isolated and analyzed with microscopy. In addition cells can be isolated from the different tissues for further descriptive analysis (e.g. FACS of cell surface expression) and/or for functional assays (e.g. survival assay, bacterial killing capacity, T cell suppression capacity).

This *ex vivo* analysis will allow us to link surface markers between human and mouse neutrophils. Surface marker expression and nuclear morphology allow us to distinguish different neutrophil subsets in mice, in multiple organs. We can see whether the different inflammatory conditions recruit the subsets with similar dynamics. Lastly, using functional *in vitro* assays we can investigate whether the subsets differ in their capacity e.g. to kill microbes and suppress T cell proliferation like we found in humans.

Intravital imaging:

Two different strategies will be used for the imaging experiments: (1) Imaging in an acute experiment under anesthesia and (2) implanting an imaging window (such as on the breast, skin, abdomen and skull) and repeatedly image through that window. For long-term studies the animal needs to be imaged by multiple imaging sessions, and therefore imaging windows are required. From experience we know that the implantation of intracutaneous windows does not lead to post-operative discomfort.

For some research questions, the tissue needs to be visualized frequently for a relative short-period of time (up to max 2 days). It is ethically undesirable to anesthetize the animal multiple times a day, so the animal will be constantly anesthetized. We have a lot of experience in the lab with these procedures, and only well trained researchers will perform these experiments. We have observed homeostatic neutrophils respond normally to stimuli under the conditions of these experiments.

In vivo imaging will allow us to study dynamic processes that are missed in static analysis. Imaging windows allow us to image the same mouse repeatedly over time as opposed to analyzing separate mice at different timepoints, greatly reducing the amount of animals needed. Additionally, this provides paired data, introducing less variation and therefore fewer animals are needed to get statistically significant results.

At the end point of intravital microscopy, tissues will always be analyzed *ex vivo* to reduce the number of mice required.

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

The objective of this project is to gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and function of neutrophils in diverse inflammatory conditions. Below the experimental approach per inflammatory stimulus and the intervention will be described. The choices about mice strains and numbers are further explained in B.

1. Inflammatory stimulus: LPS injection

Justification: LPS is a relatively simple model for acute inflammation with which we have a lot of experience *in vivo* in humans. It is in this model where we first described the different neutrophil subsets.

Description: Mice receive a single bolus of E. coli lipopolysaccharide intravenously (i.v.).

Mice: wildtype or intravital imaging strains

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours-days

Level of discomfort: mild or moderate

2. Inflammatory stimulus: Bacterial infection

Justification: Bacterial infection is a more complex, but more physiological relevant model for acute inflammation with which we have a lot of experience *in vitro* in humans.

Description: Mice are infected with (fluorescent) staphylococci via intradermal or intraperitoneal injection as described before^{1, 2}.

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – 2 weeks

Level of discomfort: moderate

3. Inflammatory stimulus: Viral infection

Justification: Viral infection is a complex physiological relevant model for inflammation with which we have some experience *in vitro* in humans.

Description: Mice are infected with influenza virus or rhinovirus 16 via intranasal administration, as performed before (Suzanne Bal, personal communication).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – 8 weeks

Level of discomfort: moderate

4. Inflammatory stimulus: Plastic particles

Justification: The effects of microplastics on human health are currently understudied. We have found neutrophils can engulf microplastics and now want to investigate their effect on neutrophil survival and function.

Description: Microplastics (plastic particles $\leq 1 \mu\text{m}$) are administered via subcutaneous injection, via addition to the drinking water, or via i.v. injection to mimic exposure routes in humans.

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – one year

Level of discomfort: mild or moderate

5. Inflammatory stimulus: Sterile injury

Justification: Sterile injury is known to recruit neutrophils without a pathogenic stimulus. Therefore this can act as a control for pathogen infection or as a model for damage-associated molecular pattern (DAMP) release.

Description: Under anesthesia, sterile injury is inflicted in the skin by needle insertion or laser damage

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours - days

Level of discomfort: mild or moderate

6. Inflammatory stimulus: Airway allergy

Justification: Allergy is a complex physiological relevant model for chronic inflammation with which we have a lot of experience in humans.

Description: Mice are sensitized and challenged with house dust mite by intranasal administration, as performed before (Suzanne Bal, personal communication).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: 2 - 8 weeks

Level of discomfort: mild or moderate

7. Inflammatory stimulus: Solid tumor growth

Justification: Cancer is a complex physiological relevant model for chronic inflammation. The suppressive neutrophil has been described in this model.

Description: We use genetic mouse models for breast or colorectal cancer, or transfer tumor cells/pieces from these mouse models to healthy mice of the same background to increase reproducibility or for intravital imaging.

Mice: Spontaneous tumor models or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours - months

Level of discomfort: mild or moderate

These different inflammatory stimuli will be combined with the intervention described here and/or with interventions A/C/D, as described in the project proposal.

Intervention B: Adoptive transfer

Description: a single cell suspension of donor cells is administered i.v. to recipient mice.

Rationale: Firstly, (fluorescently) labeled cells will be transferred for tracking migration and function throughout the body. Cells harbouring a specific gene knockout will be transferred to study the role of this gene in specific organs/diseases. Human cells will be transferred to investigate the behavior of human neutrophils in an *in vivo*-like situation.

E.g. different neutrophil subsets might be isolated from a donor mouse and adoptively transferred to a recipient mouse to visualize their difference in functionality to accomplish milestone ii or to follow their distribution to achieve milestone vi.

Extra experimental groups: Donor mice & recipient mice.

Number of mice per group: ratio donor:recipient mostly 1:1, sometimes 2:1 or 3:1

Donor mice: wt mice, intravital imaging strains, knockout strains.

Recipient mice: wt mice, intravital imaging strains, knockout strains, immunodeficient mice. Irradiation of recipient mice to deplete their endogenous immune system might be required.

Duration of intervention: seconds - minutes

Level of discomfort: mild

The final level of discomfort depends on the inflammatory stimulus, whether the intervention is used in combination with other interventions and the choice of the readout parameter. Harvesting of organs for *ex vivo* analysis or single session intravital imaging will result only in mild discomfort, but repeated intravital imaging will probably result in moderate discomfort.

The experimental design and the exact number of animals of each experiment is determined and described in detail in a work protocol according to the advice from the Animal Welfare Body and a statistician.

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

When possible, blinding and randomization will be used to prevent bias as much as possible. For example, videos obtained with intravital imaging can be coded by an independent colleague before image analysis by the researcher.

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$. Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based on literature and/or years of experience with similar type of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

B. The animals

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

Since for our experiments the different interventions described in the different appendices will be combined, it is difficult to pinpoint the estimated numbers per intervention. Therefore here we describe the grand total of estimated numbers for our whole project.

Species: *Mus musculus*

Origin: Common breeding facility (Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium) at Utrecht University/Hubrecht institute/external licensed breeders

Estimated numbers: max. 3000

Life stages: adults

Species

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand neutrophil development, homeostasis and response to inflammation in the context of the whole organism. For the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) physiology is more extensively characterized than other animal models; (2) a large number of relevant transgenic and knock out lines is already available; (3) a large number of relevant antibodies and other compounds is already available; (4) our research shows murine neutrophils are representative for human neutrophils; (5) many procedures for intravital imaging have already been described. The zebrafish is also an animal widely used for intravital imaging, but the differentiation of zebrafish neutrophils is much less similar to human neutrophils. Since mice are mammals too, they are closer to the human.

Mice strains used are amongst others:

- Wildtype BL/6
- Wildtype Balb/c
- Wildtype FVB
- LysM-GFP mice; for visualization of fluorescent neutrophils in intravital imaging. We are already working with this strain.
- Catchup^{IVM} mice (Ly6G-Cre + Rosa-Td-Tomato); for visualization of fluorescent neutrophils in intravital imaging and for conditional knockouts in neutrophils⁵. This strain was very recently created, we want to import this strain. If the results will be superior to LysM-GFP mice, we will switch to this strain.
- MRP/S100A8-Tg-EGFP-Cre; for conditional knockouts in neutrophil progenitors⁶. We want to import this strain. As opposed to the Catchup^{IVM} mice, Cre recombinase is expressed in granulocyte-macrophage progenitors in the bone marrow.

- Knockout mice (e.g. CD11b-knockout mice); to investigate the role of a specific gene or protein
- Tumor models such as MMTV-PyMT, MMTV-Wnt1 or C26 colorectal cancer mice. In our currently running animal experiments we are comparing different tumor models with each other, to optimize for future experiments. Therefore we have not completely decided which tumor models we will use in the next five years, but it will be a model that is similar in execution and discomfort as the here mentioned examples.
- Humanized mice⁷ or immunocompromised mice (e.g. NSG mice); to investigate the behavior of human neutrophils in an *in vivo*-like situation.

If the required genetically modified mouse is not available, we will obtain this model by generating, importing or by crossing existing models. Other strains will be used when in the next five years, novel strains are described or created that are very relevant to our hypotheses.

Estimated numbers

Our experiments can be divided into:

- Descriptive analysis (5-15 animals x max 5 time points = max 75 animals)
- Functional assays (5-15 animals x max 5 time points = max 75 animals)
- Intravital imaging (5-10 animals)

This totals to 55-160 animals

However, we have 7 inflammatory stimuli, 4 interventions and no intervention per stimuli = 35 conditions.

So for the total we have to multiply the 55-160 animals with 35 = 1925-5600 animals

However, these numbers are overestimations because:

- Controls can be shared between experiments when these are performed simultaneously
- Descriptive single cell and functional assays will be combined when neutrophil numbers allow this
- When differences between groups turn out to be very striking, we do not need the maximum number of mice per group
- Successful pilot studies may be included in the dataset

Therefore we do not anticipate we will need more than 2500 mice for the experiments.

Additionally, a number of ca. 500 mice is needed for:

- Maintenance of breeding
- Creation of new knockout models
- Pilot studies for validation of models/techniques
- Training of new personnel or new techniques
- Rederivation of imported strains via embryo transfer
- To compensate for unforeseen loss of animals (max 10%, e.g. due to location not suitable for imaging, problems with the window)

Mice that become surplus during breeding, will be used for pilot studies and training purposes.

Together we therefore anticipate we need a grand total of 3000 mice.

Sex

In general, we will try to use both male and female mice. However, it is clear that the immune response of males and females can greatly differ⁸. Therefore, we will perform pilot studies to ensure that the sex of the animal does not pose a bias in answering the particular research question. These pilots may prove it necessary to use only one sex within one animal experiment, to be able to reliably compare experimental groups.

One clear exception is the MMTV-PyMT breast cancer model; in this model only female mice consistently develop breast tumors.

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:

Immune responses are highly complex and multifaceted. Multiple compartments such as the bone marrow, spleen, endothelial wall and inflamed tissue interact. Certain aspects of the immune response can be separately simulated *in vitro*, but it is not yet possible to study the full course of infection and the elicited immune response *in vitro*. This requires animal models. Similarly, the use of experimental interventions to test their potential beneficial impact on the course of disease can only be assessed in animal models. Clearly, such experimental interventions cannot be performed in patients, while *in vitro* studies with isolated human cells do not capture the full complexity of infection. However, before turning to mice, we will first study human cells *in vitro* to ensure we only perform the most relevant experiments in mice.

Reduction:

Intravital imaging using imaging windows allows us to image the same mouse repeatedly over time as opposed to analyzing separate mice at different timepoints greatly reducing the amount of animals needed. Additionally, this provides paired data, introducing less variation and therefore fewer animals are needed to get statistical significant results. Statistical power calculation based on our own previous experience and literature will be used to determine the optimal number of mice for each experimental group. Moreover, experiments will be performed sequentially, based on the described go/no-go decisions, via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative. Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible.

Refinement:

Except for mice with windows, where co-housing can give problems, mice will be housed in groups in cages. Nesting opportunities will always be provided. Mice with windows will be monitored at least twice a week, mice after bacterial or viral infection will be monitored at least every other day, more if necessary, for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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

As described under refinement, mice welfare will be regularly monitored. Mice reaching the humane endpoints or otherwise suffering from severe discomfort will be euthanized. New personnel will be trained to recognize discomfort in mice according to current guidelines (e.g. ⁹). Surgical exposure will be performed under aseptic conditions using sterile instruments. Heating devices will be used to ensure a stable body temperature of the mouse during anaesthesia. Personnel conducting the surgeries is first properly trained, starting with training on cadavers.

Surgical exposure will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Pre- and post-procedural analgesia will be used when indicated or when pain-related behavior is observed. However, common analgesics such as opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to significantly alter the immune response¹⁰⁻¹². Since this is our main research topic, we might sometimes refrain from using analgesia. It may be necessary to do pilot studies to prove whether analgesics pose a bias in answering our particular research question. From literature, it seems buprenorphine may be a reasonable candidate¹³.

There are no expected adverse effects on the environment.

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.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

Mice with an imaging window will be housed individually to prevent other mice from biting or damaging the window.

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Surgical exposure will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Pre- and post-procedural analgesia will be used when indicated or when pain-related behavior is observed. However, common analgesics such as opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to significantly alter the immune response¹⁰⁻¹². Since this is our main research topic, we might sometimes refrain from using analgesia. However, pain can also influence the immune system. Therefore, it may be necessary to do pilot studies to prove whether analgesics pose a bias in answering our particular research question.

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

Surgical exposure will be performed under aseptic conditions using sterile instruments. Heating devices will be used to ensure a stable body temperature of the mouse during anaesthesia. Personnel conducting the surgeries is first properly trained, starting with training on cadavers. Before, during and after surgery adequate anesthesia and analgesia (e.g. isoflurane and buprenorphine) will be used, according to experience as well as published protocols. New personnel will be trained to recognize discomfort in mice according to current guidelines (e.g. ⁹).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will consist of a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than moderate discomfort. Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. All relevant scientific data can and will be gathered *before* the cancer, infection or allergy studies reach a level of severe discomfort. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

It is expected that no animals (0%) will be experiencing more than mild discomfort due to the genetic modification. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect. So, in all cases, animals will be carefully monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day and analyzed when possible.

Animals may lose their window (<5%). In the vast majority of these animals (>95%), we notice signs of

detachment of the window far before it becomes loose, and the mice will be sacrificed. In the remaining animals, the window loss will be noticed within 24hrs and the mouse will be immediately sacrificed.

Explain why these effects may emerge.

Tumor development, inflicted inflammation, genetic alterations and administration of compounds/ drugs/ chemicals/ toxins.

It is unclear why some animals may lose their windows.

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

Mice with windows will be monitored at least twice a week, mice after bacterial or viral infection will be monitored at least every other day, more if necessary, for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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.

As described in D, F, H and I, the experiments will be set-up in such a way that the incidence of reaching the humane end-point is kept to a minimum.

Weight loss (>20% in comparison with control or original weight or 15% weight loss in two days), reaching a score of 4 on the illness scale (specified below), severe shortness of breath, or loss of window is set as a humane end point. For all tumor models the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed, taking into account e.g. the size, location and ulceration of the tumor(s).

Next to model-specific parameters, an illness grading scale will always be used to score a set of clinical features detected in mice with different degrees of illness:

0: healthy

1: barely ruffled fur

2: ruffled fur, but active

3: ruffled fur and inactive

4: ruffled fur, inactive, hunched, and gaunt

5: dead

Indicate the likely incidence.

Expected <5% and <1day.

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative level of discomfort is dependent on the intervention, the read-out and the animal model. The discomfort of these three range from mild to moderate. Therefore combinations of these result in moderate discomfort for the majority (~90%) of animals.

References for the whole appendix

1. Liese, J., Rooijackers, S. H., van Strijp, J. A., Novick, R. P. & Dustin, M. L. Intravital two-photon microscopy of host-pathogen interactions in a mouse model of Staphylococcus aureus skin abscess formation. *Cell. Microbiol.* **15**, 891-909 (2013).
2. Spaan, A. N. *et al.* The staphylococcal toxins gamma-haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nat. Commun.* **5**, 5438 (2014).
3. Groen, R. W. *et al.* Reconstructing the human hematopoietic niche in immunodeficient mice: opportunities for studying primary multiple myeloma. *Blood* **120**, e9-e16 (2012).
4. Levy, L. *et al.* Splenectomy inhibits non-small cell lung cancer growth by modulating anti-tumor adaptive and innate immune response. *Oncoimmunology* **4**, e998469 (2015).
5. Hasenberg, A. *et al.* Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nat. Methods* **12**, 445-452 (2015).
6. Lagasse, E. & Weissman, I. L. Bcl-2 Inhibits Apoptosis of Neutrophils but Not their Engulfment by Macrophages. *J. Exp. Med.* **179**, 1047-1052 (1994).
7. Coughlan, A. M., Freeley, S. J. & Robson, M. G. Animal models of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **169**, 229-237 (2012).
8. Gubbels Bupp, M. R. Sex, the aging immune system, and chronic disease. *Cell. Immunol.* **294**, 102-110 (2015).
9. Burkholder, T., Foltz, C., Karlsson, E., Linton, C. G. & Smith, J. M. Health Evaluation of Experimental Laboratory

Mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **2**, 145-165 (2012).

10. Salimi, V. *et al.* Opioid receptors control viral replication in the airways. *Crit. Care Med.* **41**, 205-214 (2013).

11. Sacerdote, P. Opioids and the immune system. *Palliat. Med.* **20 Suppl 1**, s9-15 (2006).

12. Hish, G. A., Diaz, J. A., Hawley, A. E., Myers, D. D. & Lester, P. A. Effects of Analgesic Use on Inflammation and Hematology in a Murine Model of Venous Thrombosis. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **53**, 485-493 (2014).

13. Mundt, S., Groettrup, M. & Basler, M. Analgesia in mice with experimental meningitis reduces pain without altering immune parameters. *ALTEX* **32**, 183-189 (2015).

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.

In order to obtain organs and isolated cells for *ex vivo* analysis the mice must first be 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'.	11500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 3	Type of animal procedure Bone marrow scaffold

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.

The objective of this project is to gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and function of neutrophils in diverse inflammatory conditions. In order to achieve this we need to implant a bone marrow scaffold to:

- Visualize the migratory behavior of neutrophils and different neutrophil subsets in the bone marrow. More specifically, we can monitor the recruitment of young banded neutrophils to the circulation upon inflammatory stimuli and establish whether [redacted] through the [redacted] (as our own data in humans predict) or only [redacted] (as has been reported in literature).
- Investigate whether [redacted] can [redacted] or rather that [redacted]

The readout of each animal experiment will consist of some or all of the following:

- descriptive data on single cell level (flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.)
- functional data (on specific functions of the neutrophil such as migration, phagocytosis, etc)
- intravital microscopy data
- descriptive data on disease progression (e.g. weight loss, microbial load, tumor size).

The methods for obtaining these readout parameters will be the same for all experiments in this proposal, but the inflammatory stimulus will differ per experiment. The purpose of our experiments is to compare the neutrophil populations between all the different inflammatory conditions.

Ex vivo analysis:

In order to study the origin and kinetics of the neutrophil populations we need to investigate the different relevant organs. Neutrophils develop in the bone marrow and occasionally the spleen and subsequently migrate through the blood to the inflammatory site. In addition, neutrophils are thought to reside in the

lungs and liver (marginated pool). All these organs are therefore relevant for our studies. Whenever we will perform animal experiments we will therefore harvest multiple organs for our analysis. After the different interventions, tissues can be isolated and analyzed with microscopy. In addition cells can be isolated from the different tissues for further descriptive analysis (e.g. FACS of cell surface expression) and/or for functional assays (e.g. survival assay, bacterial killing capacity, T cell suppression capacity).

This *ex vivo* analysis will allow us to link surface markers between human and mouse neutrophils. Surface marker expression and nuclear morphology allow us to distinguish different neutrophil subsets in mice, in multiple organs. We can see whether the different inflammatory conditions recruit the subsets with similar dynamics. Lastly, using functional *in vitro* assays we can investigate whether the subsets differ in their capacity e.g. to kill microbes and suppress T cell proliferation like we found in humans.

Intravital imaging:

Two different strategies will be used for the imaging experiments: (1) Imaging in an acute experiment under anesthesia and (2) implanting an imaging window (such as on the breast, skin, abdomen and skull) and repeatedly image through that window. For long-term studies the animal needs to be imaged by multiple imaging sessions, and therefore imaging windows are required. From experience we know that the implantation of intracutaneous windows does not lead to post-operative discomfort.

For some research questions, the tissue needs to be visualized frequently for a relative short-period of time (up to max 2 days). It is ethically undesirable to anesthetize the animal multiple times a day, so the animal will be constantly anesthetized. We have a lot of experience in the lab with these procedures, and only well trained researchers will perform these experiments. We have observed homeostatic neutrophils respond normally to stimuli under the conditions of these experiments.

In vivo imaging will allow us to study dynamic processes that are missed in static analysis. Imaging windows allow us to image the same mouse repeatedly over time as opposed to analyzing separate mice at different timepoints, greatly reducing the amount of animals needed. Additionally, this provides paired data, introducing less variation and therefore fewer animals are needed to get statistically significant results.

At the end point of intravital microscopy, tissues will always be analyzed *ex vivo* to reduce the number of mice required.

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

The objective of this project is to gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and function of neutrophils in diverse inflammatory conditions. Below the experimental approach per inflammatory stimulus and the intervention will be described. The choices about mice strains and numbers are further explained in B.

1. Inflammatory stimulus: LPS injection

Justification: LPS is a relatively simple model for acute inflammation with which we have a lot of experience *in vivo* in humans. It is in this model where we first described the different neutrophil subsets.

Description: Mice receive a single bolus of E. coli lipopolysaccharide intravenously (i.v.).

Mice: wildtype or intravital imaging strains

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours-days

Level of discomfort: mild or moderate

2. Inflammatory stimulus: Bacterial infection

Justification: Bacterial infection is a more complex, but more physiological relevant model for acute inflammation with which we have a lot of experience *in vitro* in humans.

Description: Mice are infected with (fluorescent) staphylococci via intradermal or intraperitoneal injection as described before^{1, 2}.

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – 2 weeks

Level of discomfort: moderate

3. Inflammatory stimulus: Viral infection

Justification: Viral infection is a complex physiological relevant model for inflammation with which we have some experience *in vitro* in humans.

Description: Mice are infected with influenza virus or rhinovirus 16 via intranasal administration, as performed before (Suzanne Bal, personal communication).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – 8 weeks

Level of discomfort: moderate

4. Inflammatory stimulus: Plastic particles

Justification: The effects of microplastics on human health are currently understudied. We have found neutrophils can engulf microplastics and now want to investigate their effect on neutrophil survival and function.

Description: Microplastics (plastic particles $\leq 1 \mu\text{m}$) are administered via subcutaneous injection, via addition to the drinking water, or via i.v. injection to mimic exposure routes in humans.

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – one year

Level of discomfort: mild or moderate

5. Inflammatory stimulus: Sterile injury

Justification: Sterile injury is known to recruit neutrophils without a pathogenic stimulus. Therefore this can act as a control for pathogen infection or as a model for damage-associated molecular pattern (DAMP) release.

Description: Under anesthesia, sterile injury is inflicted in the skin by needle insertion or laser damage

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.
We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours - days

Level of discomfort: mild or moderate

6. Inflammatory stimulus: Airway allergy

Justification: Allergy is a complex physiological relevant model for chronic inflammation with which we have a lot of experience in humans.

Description: Mice are sensitized and challenged with house dust mite by intranasal administration, as performed before (Suzanne Bal, personal communication).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: 2 - 8 weeks

Level of discomfort: mild or moderate

7. Inflammatory stimulus: Solid tumor growth

Justification: Cancer is a complex physiological relevant model for chronic inflammation. The suppressive neutrophil has been described in this model.

Description: We use genetic mouse models for breast or colorectal cancer, or transfer tumor cells/pieces from these mouse models to healthy mice of the same background to increase reproducibility or for intravital imaging.

Mice: Spontaneous tumor models or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours - months

Level of discomfort: mild or moderate

These different inflammatory stimuli will be combined with the intervention described here and/or with interventions A/B/D, as described in the project proposal.

Intervention C: Bone marrow scaffold

Description: Biphasic calcium phosphate particles loaded with human MSCs will be implanted subcutaneously in immunodeficient mice to create a niche for hematopoiesis.

Rationale: To study neutrophil progenitors and differentiation. Intravital imaging of the bone marrow compartment is hard due to the solid thick nature of the surrounding bone. In a pilot study we have successfully placed an imaging window on a subcutaneous bone marrow scaffold allowing the visualization of cells in the bone marrow³.

E.g. we will be able to visualize neutrophils exiting (milestone vi) or re-entering (milestone viii) the bone marrow

Extra experimental groups: With vs. without bone marrow scaffold.

Number of mice per group: as described per inflammatory stimulus

Duration of intervention: days - months

Level of discomfort: moderate during surgery, mild thereafter

The final level of discomfort depends on the inflammatory stimulus, whether the intervention is used in combination with other interventions and the choice of the readout parameter. Harvesting of organs for *ex vivo* analysis or single session intravital imaging will result only in mild discomfort, but repeated intravital imaging will probably result in moderate discomfort.

The experimental design and the exact number of animals of each experiment is determined and described in detail in a work protocol according to the advice from the Animal Welfare Body and a statistician.

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

When possible, blinding and randomization will be used to prevent bias as much as possible. For example, videos obtained with intravital imaging can be coded by an independent colleague before image analysis by the researcher.

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$. Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based on literature and/or years of experience with similar type of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

B. The animals

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

Since for our experiments the different interventions described in the different appendices will be combined, it is difficult to pinpoint the estimated numbers per intervention. Therefore here we describe the grand total of estimated numbers for our whole project.

Species: *Mus musculus*

Origin: Common breeding facility (Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium) at Utrecht University/Hubrecht institute/external licensed breeders

Estimated numbers: max. 3000

Life stages: adults

Species

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand neutrophil development, homeostasis and response to inflammation in the context of the whole organism. For the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) physiology is more extensively characterized than other animal models; (2) a large number of relevant transgenic and knock out lines is already available; (3) a large number of relevant antibodies and other compounds is already available; (4) our research shows murine neutrophils are representative for human neutrophils; (5) many procedures for intravital imaging have already been described. The zebrafish is also an animal widely used for intravital imaging, but the differentiation of zebrafish neutrophils is much less similar to human neutrophils. Since mice are mammals too, they are closer to the human.

Mice strains used are amongst others:

- Wildtype BL/6
- Wildtype Balb/c
- Wildtype FVB
- LysM-GFP mice; for visualization of fluorescent neutrophils in intravital imaging. We are already working with this strain.
- Catchup^{IVM} mice (Ly6G-Cre + Rosa-Td-Tomato); for visualization of fluorescent neutrophils in intravital imaging and for conditional knockouts in neutrophils⁵. This strain was very recently created, we want to import this strain. If the results will be superior to LysM-GFP mice, we will switch to this strain.
- MRP/S100A8-Tg-EGFP-Cre; for conditional knockouts in neutrophil progenitors⁶. We want to import this strain. As opposed to the Catchup^{IVM} mice, Cre recombinase is expressed in granulocyte-macrophage progenitors in the bone marrow.
- Knockout mice (e.g. CD11b-knockout mice); to investigate the role of a specific gene or protein

- Tumor models such as MMTV-PyMT, MMTV-Wnt1 or C26 colorectal cancer mice. In our currently running animal experiments we are comparing different tumor models with each other, to optimize for future experiments. Therefore we have not completely decided which tumor models we will use in the next five years, but it will be a model that is similar in execution and discomfort as the here mentioned examples.
- Humanized mice⁷ or immunocompromised mice (e.g. NSG mice); to investigate the behavior of human neutrophils in an *in vivo*-like situation.

If the required genetically modified mouse is not available, we will obtain this model by generating, importing or by crossing existing models. Other strains will be used when in the next five years, novel strains are described or created that are very relevant to our hypotheses.

Estimated numbers

Our experiments can be divided into:

- Descriptive analysis (5-15 animals x max 5 time points = max 75 animals)
- Functional assays (5-15 animals x max 5 time points = max 75 animals)
- Intravital imaging (5-10 animals)

This totals to 55-160 animals

However, we have 7 inflammatory stimuli, 4 interventions and no intervention per stimuli = 35 conditions.

So for the total we have to multiply the 55-160 animals with 35 = 1925-5600 animals

However, these numbers are overestimations because:

- Controls can be shared between experiments when these are performed simultaneously
- Descriptive single cell and functional assays will be combined when neutrophil numbers allow this
- When differences between groups turn out to be very striking, we do not need the maximum number of mice per group
- Successful pilot studies may be included in the dataset

Therefore we do not anticipate we will need more than 2500 mice for the experiments.

Additionally, a number of ca. 500 mice is needed for:

- Maintenance of breeding
- Creation of new knockout models
- Pilot studies for validation of models/techniques
- Training of new personnel or new techniques
- Rederivation of imported strains via embryo transfer
- To compensate for unforeseen loss of animals (max 10%, e.g. due to location not suitable for imaging, problems with the window)

Mice that become surplus during breeding, will be used for pilot studies and training purposes.

Together we therefore anticipate we need a grand total of 3000 mice.

Sex

In general, we will try to use both male and female mice. However, it is clear that the immune response of males and females can greatly differ⁸. Therefore, we will perform pilot studies to ensure that the sex of the animal does not pose a bias in answering the particular research question. These pilots may prove it necessary to use only one sex within one animal experiment, to be able to reliably compare experimental groups.

One clear exception is the MMTV-PyMT breast cancer model; in this model only female mice consistently develop breast tumors.

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:

Immune responses are highly complex and multifaceted. Multiple compartments such as the bone marrow, spleen, endothelial wall and inflamed tissue interact. Certain aspects of the immune response can be separately simulated *in vitro*, but it is not yet possible to study the full course of infection and the elicited immune response *in vitro*. This requires animal models. Similarly, the use of experimental interventions to test their potential beneficial impact on the course of disease can only be assessed in animal models. Clearly, such experimental interventions cannot be performed in patients, while *in vitro* studies with isolated human cells do not capture the full complexity of infection. However, before turning to mice, we will first study human cells *in vitro* to ensure we only perform the most relevant experiments in mice.

Reduction:

Intravital imaging using imaging windows allows us to image the same mouse repeatedly over time as opposed to analyzing separate mice at different timepoints greatly reducing the amount of animals needed. Additionally, this provides paired data, introducing less variation and therefore fewer animals are needed to get statistical significant results. Statistical power calculation based on our own previous experience and literature will be used to determine the optimal number of mice for each experimental group. Moreover, experiments will be performed sequentially, based on the described go/no-go decisions, via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative. Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible.

Refinement:

Except for mice with windows, where co-housing can give problems, mice will be housed in groups in cages. Nesting opportunities will always be provided. Mice with windows will be monitored at least twice a week, mice after bacterial or viral infection will be monitored at least every other day, more if necessary, for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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

As described under refinement, mice welfare will be regularly monitored. Mice reaching the humane endpoints or otherwise suffering from severe discomfort will be euthanized. New personnel will be trained to recognize discomfort in mice according to current guidelines (e.g. ⁹). Surgical exposure will be performed under aseptic conditions using sterile instruments. Heating devices will be used to ensure a stable body temperature of the mouse during anaesthesia. Personnel conducting the surgeries is first properly trained, starting with training on cadavers.

Surgical exposure will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Pre- and post-procedural analgesia will be used when indicated or when pain-related behavior is observed. However, common analgesics such as opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to significantly alter the immune response¹⁰⁻¹². Since this is our main research topic, we might sometimes refrain from using analgesia. It may be necessary to do pilot studies to prove whether analgesics pose a bias in answering our particular research question. From literature, it seems buprenorphine may be a reasonable candidate¹³.

There are no expected adverse effects on the environment.

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.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

Mice with an imaging window will be housed individually to prevent other mice from biting or damaging the window.

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Surgical exposure will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Pre- and post-procedural analgesia will be used when indicated or when pain-related behavior is observed. However, common analgesics such as opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to significantly alter the immune response¹⁰⁻¹². Since this is our main research topic, we might sometimes refrain from using analgesia. However, pain can also influence the immune system. Therefore, it may be necessary to do pilot studies to prove whether analgesics pose a bias in answering our particular research question.

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

Surgical exposure will be performed under aseptic conditions using sterile instruments. Heating devices will be used to ensure a stable body temperature of the mouse during anaesthesia. Personnel conducting the surgeries is first properly trained, starting with training on cadavers. Before, during and after surgery adequate anesthesia and analgesia (e.g. isoflurane and buprenorphine) will be used, according to experience as well as published protocols. New personnel will be trained to recognize discomfort in mice according to current guidelines (e.g. ⁹).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will consist of a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than moderate discomfort. Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. All relevant scientific data can and will be gathered *before* the cancer, infection or allergy studies reach a level of severe discomfort. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

It is expected that no animals (0%) will be experiencing more than mild discomfort due to the genetic modification. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect. So, in all cases, animals will be carefully monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day and analyzed when possible.

Animals may lose their window (<5%). In the vast majority of these animals (>95%), we notice signs of detachment of the window far before it becomes loose, and the mice will be sacrificed. In the remaining

animals, the window loss will be noticed within 24hrs and the mouse will be immediately sacrificed.

Explain why these effects may emerge.

Tumor development, inflicted inflammation, genetic alterations and administration of compounds/ drugs/ chemicals/ toxins.

It is unclear why some animals may lose their windows.

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

Mice with windows will be monitored at least twice a week, mice after bacterial or viral infection will be monitored at least every other day, more if necessary, for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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.

As described in D, F, H and I, the experiments will be set-up in such a way that the incidence of reaching the humane end-point is kept to a minimum.

Weight loss (>20% in comparison with control or original weight or 15% weight loss in two days), reaching a score of 4 on the illness scale (specified below), severe shortness of breath, or loss of window is set as a humane end point. For all tumor models the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed, taking into account e.g. the size, location and ulceration of the tumor(s).

Next to model-specific parameters, an illness grading scale will always be used to score a set of clinical features detected in mice with different degrees of illness:

0: healthy

1: barely ruffled fur

2: ruffled fur, but active

3: ruffled fur and inactive

4: ruffled fur, inactive, hunched, and gaunt

5: dead

Indicate the likely incidence.

Expected <5% and <1day.

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative level of discomfort is dependent on the intervention, the read-out and the animal model. The discomfort of these three range from mild to moderate. Therefore combinations of these result in moderate discomfort for the majority (~90%) of animals.

References for the whole appendix

1. Liese, J., Rooijackers, S. H., van Strijp, J. A., Novick, R. P. & Dustin, M. L. Intravital two-photon microscopy of host-pathogen interactions in a mouse model of Staphylococcus aureus skin abscess formation. *Cell. Microbiol.* **15**, 891-909 (2013).
2. Spaan, A. N. *et al.* The staphylococcal toxins gamma-haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nat. Commun.* **5**, 5438 (2014).
3. Groen, R. W. *et al.* Reconstructing the human hematopoietic niche in immunodeficient mice: opportunities for studying primary multiple myeloma. *Blood* **120**, e9-e16 (2012).
4. Levy, L. *et al.* Splenectomy inhibits non-small cell lung cancer growth by modulating anti-tumor adaptive and innate immune response. *Oncimmunology* **4**, e998469 (2015).
5. Hasenberg, A. *et al.* Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nat. Methods* **12**, 445-452 (2015).
6. Lagasse, E. & Weissman, I. L. Bcl-2 Inhibits Apoptosis of Neutrophils but Not their Engulfment by Macrophages. *J. Exp. Med.* **179**, 1047-1052 (1994).
7. Coughlan, A. M., Freeley, S. J. & Robson, M. G. Animal models of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **169**, 229-237 (2012).
8. Gubbels Bupp, M. R. Sex, the aging immune system, and chronic disease. *Cell. Immunol.* **294**, 102-110 (2015).
9. Burkholder, T., Foltz, C., Karlsson, E., Linton, C. G. & Smith, J. M. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **2**, 145-165 (2012).

10. Salimi, V. *et al.* Opioid receptors control viral replication in the airways. *Crit. Care Med.* **41**, 205-214 (2013).
11. Sacerdote, P. Opioids and the immune system. *Palliat. Med.* **20 Suppl 1**, s9-15 (2006).
12. Hish, G. A., Diaz, J. A., Hawley, A. E., Myers, D. D. & Lester, P. A. Effects of Analgesic Use on Inflammation and Hematology in a Murine Model of Venous Thrombosis. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **53**, 485-493 (2014).
13. Mundt, S., Groettrup, M. & Basler, M. Analgesia in mice with experimental meningitis reduces pain without altering immune parameters. *ALTEX* **32**, 183-189 (2015).

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.

In order to obtain organs and isolated cells for *ex vivo* analysis the mice must first be 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'.	11500	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	UMC Utrecht	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 4	Type of animal procedure Splenectomy

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.

The objective of this project is to gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and function of neutrophils in diverse inflammatory conditions. We hypothesize that the [redacted] in the [redacted] (milestone ix). Although the dogma is that these cell are [redacted], our preliminary data [redacted] are [redacted], suggesting these cells either [redacted] not the [redacted] or alternatively [redacted]. To confirm this we need to perform splenectomy in mice.

The readout of each animal experiment will consist of some or all of the following:

- descriptive data on single cell level (flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.)
- functional data (on specific functions of the neutrophil such as migration, phagocytosis, etc)
- intravital microscopy data
- descriptive data on disease progression (e.g. weight loss, microbial load, tumor size).

The methods for obtaining these readout parameters will be the same for all experiments in this proposal, but the inflammatory stimulus will differ per experiment. The purpose of our experiments is to compare the neutrophil populations between all the different inflammatory conditions.

Ex vivo analysis:

In order to study the origin and kinetics of the neutrophil populations we need to investigate the different relevant organs. Neutrophils develop in the bone marrow and occasionally the spleen and subsequently migrate through the blood to the inflammatory site. In addition, neutrophils are thought to reside in the lungs and liver (marginated pool). All these organs are therefore relevant for our studies. Whenever we will perform animal experiments we will therefore harvest multiple organs for our analysis. After the different interventions, tissues can be isolated and analyzed with microscopy. In addition cells

can be isolated from the different tissues for further descriptive analysis (e.g. FACS of cell surface expression) and/or for functional assays (e.g. survival assay, bacterial killing capacity, T cell suppression capacity).

This *ex vivo* analysis will allow us to link surface markers between human and mouse neutrophils. Surface marker expression and nuclear morphology allow us to distinguish different neutrophil subsets in mice, in multiple organs. We can see whether the different inflammatory conditions recruit the subsets with similar dynamics. Lastly, using functional *in vitro* assays we can investigate whether the subsets differ in their capacity e.g. to kill microbes and suppress T cell proliferation like we found in humans.

Intravital imaging:

Two different strategies will be used for the imaging experiments: (1) Imaging in an acute experiment under anesthesia and (2) implanting an imaging window (such as on the breast, skin, abdomen and skull) and repeatedly image through that window. For long-term studies the animal needs to be imaged by multiple imaging sessions, and therefore imaging windows are required. From experience we know that the implantation of intracutaneous windows does not lead to post-operative discomfort.

For some research questions, the tissue needs to be visualized frequently for a relative short-period of time (up to max 2 days). It is ethically undesirable to anesthetize the animal multiple times a day, so the animal will be constantly anesthetized. We have a lot of experience in the lab with these procedures, and only well trained researchers will perform these experiments. We have observed homeostatic neutrophils respond normally to stimuli under the conditions of these experiments.

In vivo imaging will allow us to study dynamic processes that are missed in static analysis. Imaging windows allow us to image the same mouse repeatedly over time as opposed to analyzing separate mice at different timepoints, greatly reducing the amount of animals needed. Additionally, this provides paired data, introducing less variation and therefore fewer animals are needed to get statistically significant results.

At the end point of intravital microscopy, tissues will always be analyzed *ex vivo* to reduce the number of mice required.

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

The objective of this project is to gain more fundamental knowledge on origin, timing, localization and function of neutrophils in diverse inflammatory conditions. Below the experimental approach per inflammatory stimulus and the intervention will be described. The choices about mice strains and numbers are further explained in B.

1. Inflammatory stimulus: LPS injection

Justification: LPS is a relatively simple model for acute inflammation with which we have a lot of experience *in vivo* in humans. It is in this model where we first described the different neutrophil subsets.

Description: Mice receive a single bolus of E. coli lipopolysaccharide intravenously (i.v.).

Mice: wildtype or intravital imaging strains

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours-days

Level of discomfort: mild or moderate

2. Inflammatory stimulus: Bacterial infection

Justification: Bacterial infection is a more complex, but more physiological relevant model for acute inflammation with which we have a lot of experience *in vitro* in humans.

Description: Mice are infected with (fluorescent) staphylococci via intradermal or intraperitoneal injection as described before^{1, 2}.

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – 2 weeks

Level of discomfort: moderate

3. Inflammatory stimulus: Viral infection

Justification: Viral infection is a complex physiological relevant model for inflammation with which we have some experience *in vitro* in humans.

Description: Mice are infected with influenza virus or rhinovirus 16 via intranasal administration, as performed before (Suzanne Bal, personal communication).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – 8 weeks

Level of discomfort: moderate

4. Inflammatory stimulus: Plastic particles

Justification: The effects of microplastics on human health are currently understudied. We have found neutrophils can engulf microplastics and now want to investigate their effect on neutrophil survival and function.

Description: Microplastics (plastic particles $\leq 1 \mu\text{m}$) are administered via subcutaneous injection, via addition to the drinking water, or via i.v. injection to mimic exposure routes in humans.

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – one year

Level of discomfort: mild or moderate

5. Inflammatory stimulus: Sterile injury

Justification: Sterile injury is known to recruit neutrophils without a pathogenic stimulus. Therefore this can act as a control for pathogen infection or as a model for damage-associated molecular pattern (DAMP) release.

Description: Under anesthesia, sterile injury is inflicted in the skin by needle insertion or laser damage

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on

general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours - days

Level of discomfort: mild or moderate

6. Inflammatory stimulus: Airway allergy

Justification: Allergy is a complex physiological relevant model for chronic inflammation with which we have a lot of experience in humans.

Description: Mice are sensitized and challenged with house dust mite by intranasal administration, as performed before (Suzanne Bal, personal communication).

Mice: wildtype or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: 2 – 8 weeks

Level of discomfort: mild or moderate

7. Inflammatory stimulus: Solid tumor growth

Justification: Cancer is a complex physiological relevant model for chronic inflammation. The suppressive neutrophil has been described in this model.

Description: We use genetic mouse models for breast or colorectal cancer, or transfer tumor cells/pieces from these mouse models to healthy mice of the same background to increase reproducibility or for intravital imaging.

Mice: Spontaneous tumor models or intravital imaging strains or knockout strains.

Experimental groups: control + 5 different timepoints.

Neutrophil dynamics change over time, so multiple time-points need to be measured.

Readout parameters: descriptive analysis of neutrophils (e.g. flow cytometry, microscopy, protein expression, etc.) and/or *in vitro* functional assays and/or intravital imaging.

Number of mice per group: 5-15 mice

We know from experience that for *ex vivo* characterization & *in vitro* functional assays we need to analyze 5-15 mice to quantitatively determine differences.

We know from experience that we need to image 5-10 mice to capture enough footage for conclusions on general patterns of neutrophil behavior *in vivo*.

Duration: hours – months

Level of discomfort: mild or moderate

These different inflammatory stimuli will be combined with the intervention described here and/or with interventions A/B/C, as described in the project proposal.

Intervention D: Splenectomy

Description: Surgery to remove the spleen is performed as described before⁴.

Rationale: Since we hypothesize that the [REDACTED] and neutrophil [REDACTED] (milestone ix), we will study the effect of [REDACTED]. Data from [REDACTED] suggest that the [REDACTED] to the [REDACTED].

Extra experimental groups: Splenectomized vs. non-splenectomized

Number of mice per group: as described per inflammatory stimulus.

Duration of intervention: hours

Level of discomfort: moderate during surgery, mild thereafter

The final level of discomfort depends on the inflammatory stimulus, whether the intervention is used in combination with other interventions and the choice of the readout parameter. Harvesting of organs for *ex vivo* analysis or single session intravital imaging will result only in mild discomfort, but repeated intravital imaging will probably result in moderate discomfort.

The experimental design and the exact number of animals of each experiment is determined and described in detail in a work protocol according to the advice from the Animal Welfare Body and a

statistician.

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

When possible, blinding and randomization will be used to prevent bias as much as possible. For example, videos obtained with intravital imaging can be coded by an independent colleague before image analysis by the researcher.

Whenever possible we strive for a situation to express the outcome of our experiments in quantitative terms. To estimate the number of animals to be used in an experiment, we use the effect size (if known, e.g., from data in the literature, from our own historical data or if unknown from small scale pilots) to estimate the sample size needed to achieve a certain power (usually around 0.8) with appropriate statistical test like the t test with a $p < 0.05$. Qualitative analysis (most of the animal procedures described in this appendix): the number of animals (group size) is based on literature and/or years of experience with similar type of experiments. Moreover, these types of experiments will be performed sequentially via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative.

B. The animals

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

Since for our experiments the different interventions described in the different appendices will be combined, it is difficult to pinpoint the estimated numbers per intervention. Therefore here we describe the grand total of estimated numbers for our whole project.

Species: *Mus musculus*

Origin: Common breeding facility (Gemeenschappelijk Dierenlaboratorium) at Utrecht University/Hubrecht institute/external licensed breeders

Estimated numbers: max. 3000

Life stages: adults

Species

All animal studies in this project will exclusively involve mice. Up to today, there are no alternative methods to fully understand neutrophil development, homeostasis and response to inflammation in the context of the whole organism. For the proposed studies, the mouse is the most appropriate animal model because: (1) physiology is more extensively characterized than other animal models; (2) a large number of relevant transgenic and knock out lines is already available; (3) a large number of relevant antibodies and other compounds is already available; (4) our research shows murine neutrophils are representative for human neutrophils; (5) many procedures for intravital imaging have already been described. The zebrafish is also an animal widely used for intravital imaging, but the differentiation of zebrafish neutrophils is much less similar to human neutrophils. Since mice are mammals too, they are closer to the human.

Mice strains used are amongst others:

- Wildtype BL/6
- Wildtype Balb/c
- Wildtype FVB
- LysM-GFP mice; for visualization of fluorescent neutrophils in intravital imaging. We are already working with this strain.
- Catchup^{IVM} mice (Ly6G-Cre + Rosa-Td-Tomato); for visualization of fluorescent neutrophils in intravital imaging and for conditional knockouts in neutrophils⁵. This strain was very recently created, we want to import this strain. If the results will be superior to LysM-GFP mice, we will switch to this strain.
- MRP/S100A8-Tg-EGFP-Cre; for conditional knockouts in neutrophil progenitors⁶. We want to import this strain. As opposed to the Catchup^{IVM} mice, Cre recombinase is expressed in granulocyte-macrophage progenitors in the bone marrow.
- Knockout mice (e.g. CD11b-knockout mice); to investigate the role of a specific gene or protein
- Tumor models such as MMTV-PyMT, MMTV-Wnt1 or C26 colorectal cancer mice. In our currently running animal experiments we are comparing different tumor models with each other, to optimize for future experiments. Therefore we have not completely decided which tumor models we will use in the next five years, but it will be a model that is similar in execution and discomfort as the here mentioned examples.
- Humanized mice⁷ or immunocompromised mice (e.g. NSG mice); to investigate the behavior of human neutrophils in an *in vivo*-like situation.

If the required genetically modified mouse is not available, we will obtain this model by generating, importing or by crossing existing models. Other strains will be used when in the next five years, novel strains are described or created that are very relevant to our hypotheses.

Estimated numbers

Our experiments can be divided into:

- Descriptive analysis (5-15 animals x max 5 time points = max 75 animals)
- Functional assays (5-15 animals x max 5 time points = max 75 animals)
- Intravital imaging (5-10 animals)

This totals to 55-160 animals

However, we have 7 inflammatory stimuli, 4 interventions and no intervention per stimuli = 35 conditions.

So for the total we have to multiply the 55-160 animals with 35 = 1925-5600 animals

However, these numbers are overestimations because:

- Controls can be shared between experiments when these are performed simultaneously
- Descriptive single cell and functional assays will be combined when neutrophil numbers allow this
- When differences between groups turn out to be very striking, we do not need the maximum number of mice per group
- Successful pilot studies may be included in the dataset

Therefore we do not anticipate we will need more than 2500 mice for the experiments.

Additionally, a number of ca. 500 mice is needed for:

- Maintenance of breeding
- Creation of new knockout models
- Pilot studies for validation of models/techniques
- Training of new personnel or new techniques
- Rederivation of imported strains via embryo transfer
- To compensate for unforeseen loss of animals (max 10%, e.g. due to location not suitable for imaging, problems with the window)

Mice that become surplus during breeding, will be used for pilot studies and training purposes.

Together we therefore anticipate we need a grand total of 3000 mice.

Sex

In general, we will try to use both male and female mice. However, it is clear that the immune response of males and females can greatly differ⁸. Therefore, we will perform pilot studies to ensure that the sex of the animal does not pose a bias in answering the particular research question. These pilots may prove it necessary to use only one sex within one animal experiment, to be able to reliably compare experimental groups.

One clear exception is the MMTV-PyMT breast cancer model; in this model only female mice consistently develop breast tumors.

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:

Immune responses are highly complex and multifaceted. Multiple compartments such as the bone

marrow, spleen, endothelial wall and inflamed tissue interact. Certain aspects of the immune response can be separately simulated *in vitro*, but it is not yet possible to study the full course of infection and the elicited immune response *in vitro*. This requires animal models. Similarly, the use of experimental interventions to test their potential beneficial impact on the course of disease can only be assessed in animal models. Clearly, such experimental interventions cannot be performed in patients, while *in vitro* studies with isolated human cells do not capture the full complexity of infection. However, before turning to mice, we will first study human cells *in vitro* to ensure we only perform the most relevant experiments in mice.

Reduction:

Intravital imaging using imaging windows allows us to image the same mouse repeatedly over time as opposed to analyzing separate mice at different timepoints greatly reducing the amount of animals needed. Additionally, this provides paired data, introducing less variation and therefore fewer animals are needed to get statistical significant results. Statistical power calculation based on our own previous experience and literature will be used to determine the optimal number of mice for each experimental group. Moreover, experiments will be performed sequentially, based on the described go/no-go decisions, via which we ensure that we will use the minimum number of mice per group that will be informative. Whenever possible, we will perform pilot studies with the minimum number of animals possible.

Refinement:

Except for mice with windows, where co-housing can give problems, mice will be housed in groups in cages. Nesting opportunities will always be provided. Mice with windows will be monitored at least twice a week, mice after bacterial or viral infection will be monitored at least every other day, more if necessary, for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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

As described under refinement, mice welfare will be regularly monitored. Mice reaching the humane endpoints or otherwise suffering from severe discomfort will be euthanized. New personnel will be trained to recognize discomfort in mice according to current guidelines (e.g. ⁹). Surgical exposure will be performed under aseptic conditions using sterile instruments. Heating devices will be used to ensure a stable body temperature of the mouse during anaesthesia. Personnel conducting the surgeries is first properly trained, starting with training on cadavers.

Surgical exposure will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Pre- and post-procedural analgesia will be used when indicated or when pain-related behavior is observed. However, common analgesics such as opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to significantly alter the immune response¹⁰⁻¹². Since this is our main research topic, we might sometimes refrain from using analgesia. It may be necessary to do pilot studies to prove whether analgesics pose a bias in answering our particular research question. From literature, it seems buprenorphine may be a reasonable candidate¹³.

There are no expected adverse effects on the environment.

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.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

Mice with an imaging window will be housed individually to prevent other mice from biting or damaging the window.

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.

Surgical exposure will be performed under adequate anesthesia and analgesia. Pre- and post-procedural analgesia will be used when indicated or when pain-related behavior is observed. However, common analgesics such as opioids and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been shown to significantly alter the immune response¹⁰⁻¹². Since this is our main research topic, we might sometimes refrain from using analgesia. However, pain can also influence the immune system. Therefore, it may be necessary to do pilot studies to prove whether analgesics pose a bias in answering our particular research question.

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

Surgical exposure will be performed under aseptic conditions using sterile instruments. Heating devices will be used to ensure a stable body temperature of the mouse during anaesthesia. Personnel conducting the surgeries is first properly trained, starting with training on cadavers. Before, during and after surgery adequate anesthesia and analgesia (e.g. isoflurane and buprenorphine) will be used, according to experience as well as published protocols. New personnel will be trained to recognize discomfort in mice according to current guidelines (e.g. ⁹).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Other than in terminally anaesthetized animals dosing and sampling procedures will consist of a combination of volumes, routes and frequencies that will result in no more than moderate discomfort. Animals bearing tumors will never reach end-stage clinical effects. All relevant scientific data can and will be gathered *before* the cancer, infection or allergy studies reach a level of severe discomfort. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

It is expected that no animals (0%) will be experiencing more than mild discomfort due to the genetic modification. However, it is impossible to predict the nature or severity of any potential genetic defect. So, in all cases, animals will be carefully monitored for possible side effects. Animals exhibiting any unexpected harmful phenotypes will be killed within a day and analyzed when possible.

Animals may lose their window (<5%). In the vast majority of these animals (>95%), we notice signs of detachment of the window far before it becomes loose, and the mice will be sacrificed. In the remaining animals, the window loss will be noticed within 24hrs and the mouse will be immediately sacrificed.

Explain why these effects may emerge.

Tumor development, inflicted inflammation, genetic alterations and administration of compounds/ drugs/ chemicals/ toxins.

It is unclear why some animals may lose their windows.

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

Mice with windows will be monitored at least twice a week, mice after bacterial or viral infection will be monitored at least every other day, more if necessary, for clinical signs. If unexpectedly severe suffering is observed, mice will be euthanized.

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.

As described in D, F, H and I, the experiments will be set-up in such a way that the incidence of reaching the humane end-point is kept to a minimum.

Weight loss (>20% in comparison with control or original weight or 15% weight loss in two days), reaching a score of 4 on the illness scale (specified below), severe shortness of breath, or loss of window is set as an humane end point. For all tumor models the guidelines of the Code of Practice Animals in Cancer research will strictly be followed, taking into account e.g. the size, location and ulceration of the tumor(s).

Next to model-specific parameters, an illness grading scale will always be used to score a set of clinical features detected in mice with different degrees of illness:

0: healthy

1: barely ruffled fur

2: ruffled fur, but active

3: ruffled fur and inactive

4: ruffled fur, inactive, hunched, and gaunt

5: dead

Indicate the likely incidence.

Expected <5% and <1day.

K. Classification of severity of procedures

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

The cumulative level of discomfort is dependent on the intervention, the read-out and the animal model. The discomfort of these three range from mild to moderate. Therefore combinations of these result in moderate discomfort for the majority (~90%) of animals.

References for the whole appendix

1. Liese, J., Rooijackers, S. H., van Strijp, J. A., Novick, R. P. & Dustin, M. L. Intravital two-photon microscopy of host-pathogen interactions in a mouse model of Staphylococcus aureus skin abscess formation. *Cell. Microbiol.* **15**, 891-909 (2013).
2. Spaan, A. N. *et al.* The staphylococcal toxins gamma-haemolysin AB and CB differentially target phagocytes by employing specific chemokine receptors. *Nat. Commun.* **5**, 5438 (2014).
3. Groen, R. W. *et al.* Reconstructing the human hematopoietic niche in immunodeficient mice: opportunities for studying primary multiple myeloma. *Blood* **120**, e9-e16 (2012).
4. Levy, L. *et al.* Splenectomy inhibits non-small cell lung cancer growth by modulating anti-tumor adaptive and innate immune response. *Oncoimmunology* **4**, e998469 (2015).
5. Hasenberg, A. *et al.* Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nat. Methods* **12**, 445-452 (2015).
6. Lagasse, E. & Weissman, I. L. Bcl-2 Inhibits Apoptosis of Neutrophils but Not their Engulfment by Macrophages. *J. Exp. Med.* **179**, 1047-1052 (1994).
7. Coughlan, A. M., Freeley, S. J. & Robson, M. G. Animal models of anti-neutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Clin. Exp. Immunol.* **169**, 229-237 (2012).
8. Gubbels Bupp, M. R. Sex, the aging immune system, and chronic disease. *Cell. Immunol.* **294**, 102-110 (2015).
9. Burkholder, T., Foltz, C., Karlsson, E., Linton, C. G. & Smith, J. M. Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **2**, 145-165 (2012).
10. Salimi, V. *et al.* Opioid receptors control viral replication in the airways. *Crit. Care Med.* **41**, 205-214 (2013).
11. Sacerdote, P. Opioids and the immune system. *Palliat. Med.* **20 Suppl 1**, s9-15 (2006).
12. Hish, G. A., Diaz, J. A., Hawley, A. E., Myers, D. D. & Lester, P. A. Effects of Analgesic Use on Inflammation and Hematology in a Murine Model of Venous Thrombosis. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **53**, 485-493 (2014).
13. Mundt, S., Groettrup, M. & Basler, M. Analgesia in mice with experimental meningitis reduces pain without altering immune parameters. *ALTEX* **32**, 183-189 (2015).

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.

In order to obtain organs and isolated cells for *ex vivo* analysis the mice must first be 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

Beste CDD,

Het voornemen van de CCD om de aanvraag met nummer AVD115002016714 af te wijzen heeft mij compleet verrast. Mijns inziens heb ik de vragen van de CCD goed kunnen beantwoorden en ik ben erg teleurgesteld dat deze mening niet door de CCD gedeeld wordt. Door de opgegeven redenen van afwijzing moet ik concluderen dat een en ander nog niet helder genoeg is overgebracht en dat er dus nog een verbeterslag nodig is in de projectaanvraag. U vindt de aanvraag erg globaal beschreven met een groot aantal subdoelstellingen, waarvoor elk subdoel meerdere experimenten nodig zijn. Ik wil benadrukken dat de onderzoeksvraag niet breed is, maar behoorlijk afgekaderd. Namelijk, neutrofielen dynamiek in homeostase en ziekte. Deze vraag kan echter wel in gelinkte milestones beantwoord worden, zoals: wat is de levensduur, zijn er meerdere subpopulaties met meerdere functies, komen de subpopulaties voort uit dezelfde voorloper en zijn de subpopulaties en hun functie hetzelfde tussen verschillende ziektebeelden. Aangezien we aan het begin staan van een fundamentele onderzoeksvraag is de aanpak wel breed. Belangrijk is dat meerdere milestones beantwoord kunnen worden met gedeelde experimenten. Bijvoorbeeld, ex vivo analyse van neutrofielen na de diverse inflammatoire stimuli zal ons informatie geven over milestone i,ii, iv en v. Ook zullen go/no go momenten van één milestone de beslisboom beïnvloeden van andere milestones (zie voorbeeld in onderstaande alinea). Door de directe links tussen de milestones en de gedeelde experimentele aanpak is het daarom wenselijk om deze in één projectaanvraag te combineren. Het klopt inderdaad dat voor elk subdoel meerdere type experimenten nodig zijn. Dit maakt ook dat het opdelen in meerdere aanvragen niet tot een substantiële vernauwing van de experimentele aanpak zal leiden.

We bevinden ons momenteel aan het begin van de fundamentele zoektocht en dit vraagt een initieel brede experimentele aanpak. Het voorbeeld in scheme 2 van de projectaanvraag laat zien dat we voor het beantwoorden van milestone ix acht verschillende experimenten kunnen uitvoeren. Er zijn echter wel een aantal go-no go momenten ingebouwd. Dit schema laat zien dat we niet alle experimenten met alle stimuli willen uitvoeren, maar een heel gerichte beslisboom afwerken. We leggen eerst een basis zonder stimulus (exp 1 en 2), vervolgens kijken we naar de stimulus waar we aan de hand van preliminaire data het meest vertrouwen in hebben (exp 3) en pas dan gaan we kijken of we dit fenomeen ook zien bij andere meer fysiologisch relevante stimuli (exp 4 en 5b). De vervolg experimenten voeren we uit met stimuli die afhangen van exp 5b (exp 5c en 7), weer zonder stimulus (exp 6) of de initiele bekende stimulus (exp 8). Bovendien zullen de bevindingen van exp 4 en 5b van milestone ix directe consequenties hebben voor de beslisboom van bijvoorbeeld milestone xi. We hebben met dit schema gehoopt aan te geven dat de aanpak breed is, maar toch maar 8 verschillende experimenten omvat en dat we zeker niet alle stimuli zullen inzetten voor elk experiment.

Van andere geaccepteerde aanvragen, de IvD en lokale DEC had ik begrepen dat het uitwerken van 1 milestone als voorbeeld voldoende was. Maar als de brede aanpak onzekerheid geeft dan zouden we eventueel extra milestones en hun interactie kunnen uitwerken. Ook is het mogelijk om de initiele werkprotocollen en go/no go momenten bijvoorbeeld niet alleen naar de IvD, maar ook naar de CCD terug te rapporteren totdat de vervolg experimenten en dieraantallen beter gekarakteriseerd kunnen worden. Wij staan uiteraard ook open voor andere oplossingen.

Ik heb de coherentie tussen de milestones en de afkadering van experimenten duidelijker (in onderstreepte tekst) getracht te includeren in de projectaanvraag. Mochten er nog altijd vragen en onzekerheden zijn omtrent de projectaanvraag ben ik zeker ook bereid om het project persoonlijk te komen toelichten en bespreken.

Vriendelijke groet,

██████████

Van: [REDACTED] namens dec-utrecht <dec-utrecht@umcutrecht.nl>
Verzonden: woensdag 22 februari 2017 9:26
Aan: 'Info-zbo'
Onderwerp: RE: AVD115002016714
Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte leden van de CCD, geachte [REDACTED]

Bij e-mail van 16 februari jl. heeft u ons verzocht nader te adviseren op bovengenoemd project op basis van de reactie van de aanvrager d.d. 14 februari jl.

Wij hechten eraan om nog eens te herhalen dat het naar het oordeel van de DEC hier gaat om een fundamenteel onderzoek naar het voorkomen, het ontstaan, de functie en de betekenis van subsets van granulocyten. Het onderzoek is gebaseerd op bevindingen bij de mens. Uitbreiding van het onderzoek in muizen is nodig omdat het nu eenmaal zo is dat onvoldoende cellen verkregen kunnen worden bij mensen en stimulatie proeven, zoals voorgesteld in het project, om de generatie en lokalisatie van de cellen te bestuderen, niet in mensen kunnen worden uitgevoerd. De kracht van het project is dat resultaten steeds vergeleken worden met die van in vitro onderzoek bij de mens.

In een eerdere reactie van ons (zie e-mail d.d. 23 januari jl.) hebben wij opgemerkt dat het primaire doel van het onderzoek beperkt is en dat de aanpak breed moet zijn omdat de onderzoekers staan aan het begin van een exploratief project met een groot aantal deelvragen die veelal met elkaar samenhangen en logisch op elkaar volgen. De gebruikte methoden zijn adequaat om de deelvragen te beantwoorden.

Met betrekking tot de beantwoording van uw vragen is ons oordeel dat de onderzoeker uw vragen 1, 3, 4, 5, 6 en 7 goed beantwoord heeft en meer dan voldoende heeft verwerkt in de aanvraag. De experimenten zijn navolgbaar, het ongerief per handeling is ingeschat en de fok en creatie van nieuwe muizenlijnen zijn verwijderd uit de aanvraag.

Voor wat betreft de berekening/schatting van de aantallen dieren (vraag 2 van uw reactie) wijst de DEC u op het feit dat door zorgvuldig gebruik van verkregen materiaal en overlap van experimenten het benodigde aantal dieren met de helft kon worden teruggebracht.

De DEC heeft wel begrip voor uw opmerking dat de onderbouwing van de groepsgrootte aandacht behoeft en stelt daarom voor als voorwaarde op te nemen dat de IvD er op toeziet dat, nadat de eerste experimenten zijn uitgevoerd, de vervolggexperimenten onderbouwd worden met passende statistische methoden.

De DEC beoordeelt dit project als van substantieel belang en bevestigt bij deze het eerder afgegeven positief advies.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]
[REDACTED]



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

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

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

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: donderdag 16 februari 2017 12:07
Aan: dec-utrecht
Onderwerp: AVD115002016714

Geachte DEC,

Wij hebben de reactie van aanvrager ontvangen over het voorgenomen besluit van de CCD over het project 'Neutrophil subsets in health and disease' met aanvraagnummer AVD115002016714.

Aangezien u heeft aangegeven ons aanvullend te willen adviseren over dit voorgenomen besluit (zoals telefonisch besproken met [REDACTED]), sturen wij u bij deze de reactie van de aanvrager toe (zie bijlagen). Voor de volledigheid stuur ik u ook de eerder gestelde vragen door de CCD en de door de aanvrager gegeven antwoorden hierop.

Wij ontvangen uw aanvullend advies graag uiterlijk 26 februari 2017, zodat de reacties van zowel u als de aanvrager tijdens de komende CCD vergadering besproken kunnen worden.

Bij voorbaat hartelijk dank,

Met vriendelijke groet,

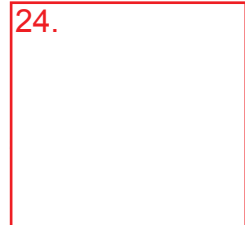
[REDACTED]

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

UMC Utrecht

[Redacted]

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
AVD115002016714
Bijlagen
1

Datum 14 maart 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 13 oktober 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Neutrophil subsets en health and disease" met aanvraagnummer AVD115002016714. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 27 januari 2017 en 15 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek heeft u in uw bijlagen per handeling voor elk model aangegeven wat de exacte handelingen zijn en het bijbehorende ongerief en gevolgen voor de dieren per model beschreven, heeft u verklaard waarom de inschatting van het aantal dieren op dit moment niet nauwkeuriger gedaan kan worden en heeft u de fok van knock-out muizen uit dit project verwijderd.

Op basis van het aan u gecommuniceerde voorgenomen besluit heeft u nader onderbouwd waarom u vindt dat het project beschreven in deze aanvraag binnen één project valt en waarom dit project breed wordt ingestoken.

De CCD heeft deze informatie meegenomen in de uiteindelijke afweging.

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 "Neutrophil subsets en health and disease" starten. De vergunning wordt afgegeven van 14 maart 2017 tot en met 31 oktober 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Datum:
14 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD115002016714

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 5 oktober 2016. 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 23 januari 2017 en 22 februari 2017 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. De DEC heeft haar advies aangevuld met informatie over de inzet van pijnbestrijding in de dierproeven. Daarnaast heeft de DEC aanvullend geadviseerd over de brede aanpak van het ingeperkte primaire doel van het onderzoek. De DEC heeft geadviseerd dat het gaat om een exploratief onderzoek met een groot aantal deelvragen die veelal met elkaar samenhangen en logisch op elkaar volgen.

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:
14 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD115002016714

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 14 maart 2017 tot en met 31 oktober 2021, voor het project "Neutrophil subsets en health and disease" met aanvraagnummer AVD115002016714, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Assistant Professor.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 13 oktober 2016
- 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 oktober 2016, ontvangen op 13 oktober 2016.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 27 januari 2017 en 15 februari 2017



Aanvraagnummer:

AVD115002016714

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 verdooving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdooving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdooving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdooving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdooving onvereenigbaar 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 verdooving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

Aanvraagnummer:

AVD115002016714

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Inventaris Wob-verzoek W17-08										
nr.	document NTS 2016766	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel			x						
4	Bijlage 1			x						
5	Bijlage 2			x						
6	Bijlage 1 aangepast			x						
7	Bijlage 2 aangepast			x						
8	DEC-advies				x		x	x		
9	Ontvangstbevestiging en factuur				x		x	x		
10	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
11	Advies CCD		x							x
12	Beschikking en vergunning				x		x	x		



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

AVD246002016766

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 24600 <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>Schothorst Feed Research B.V.</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>39084732</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Schothorst Feed Research B.V.	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	39084732									
Naam instelling of organisatie	Schothorst Feed Research B.V.																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	39084732																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Meerkoetenweg</td><td>26</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>Postbus 533</td><td></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>8200 AM</td><td>Lelystad</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL24RABO0337738394</td><td></td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Schothorst Feed Research B.V.</td><td></td></tr></table>	Straat en huisnummer	Meerkoetenweg	26	Postbus	Postbus 533		Postcode en plaats	8200 AM	Lelystad	IBAN	NL24RABO0337738394		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Schothorst Feed Research B.V.	
Straat en huisnummer	Meerkoetenweg	26															
Postbus	Postbus 533																
Postcode en plaats	8200 AM	Lelystad															
IBAN	NL24RABO0337738394																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Schothorst Feed Research B.V.																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Onderzoeker [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 type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	Onderzoeker [REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Onderzoeker [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 type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Onderzoeker [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 type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	Onderzoeker [REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Onderzoeker [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"/> 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	1 - 1 - 2017
	Einddatum	1 - 1 - 2022
3.2 Wat is de titel van het project?	Het onderzoeken van de effectiviteit van farmaceutische en alternatieve middelen en voerstrategieën tegen darminfecties bij pluimvee	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Verbeteren van darmgezondheid in pluimvee	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC Wageningen UR
	Postadres	Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen
	E-mailadres	DEC@wur.nl

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1187,00 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

2 bijlagen.

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

[Redacted]

[Redacted]

Lelystad

6 - 12 - 2016

[Redacted]



Format Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

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

Infectieziekten spelen een belangrijke rol in de pluimvee-industrie vanwege productieverliezen, verhoogde sterfte, verminderd dierwelzijn en een verhoogd besmettingsrisico van pluimveeproducten voor menselijke consumptie (Timbermont et al., 2011). Diverse pathogenen, waaronder virussen, bacteriën, en parasieten, zijn verantwoordelijk voor het ontstaan van infectieziekten, zowel alleen of in combinatie met elkaar (Antonissen et al., 2014, 2015; Stanley et al., 2014). Veel aandoeningen bij pluimvee zijn geassocieerd met darmproblemen, zoals dysbacteriose, colibacillose, malabsorptie syndroom, coccidiose, Salmonella, Campylobacter en necrotische enteritis (NE). Met name coccidiose en NE zijn wereldwijd een ernstig probleem, waarbij de gezondheid van het dier direct geschaad wordt. Naar schatting is de financiële schade als gevolg van coccidiose wereldwijd 2 miljard euro per jaar en voor necrotische enteritis rond de 6 miljard euro per jaar (www.veearts.nl; www.worldpoultry.net). Beiden worden hieronder wat gedetailleerder besproken.

Coccidiose wordt veroorzaakt door eencellige parasieten (protozoën) uit de *Eimeria* familie, die de darmcellen beschadigen. Ziekteverschijnselen zijn apathisch gedrag, bol zitten, een slecht verenkleed, natte en soms bloederige mest en een lage voeropname. Door de darmschade verslechtert de absorptie van nutriënten, met als gevolg een slechtere groei (Amerah en Ravindran, 2015). De parasiet produceert oöcysten die met de mest uitgescheiden worden en die uitermate lastig te bestrijden zijn. Daarom is het belangrijk om de infectiedruk in het dier en in de omgeving laag te houden.

Hiervoor worden bij vleeskuikens coccidiostatica in het voer gebruikt. Dit is op zichzelf een effectieve aanpak, hoewel de parasieten resistent kunnen worden tegen de actieve stof. Dat betekent dat er toch problemen met klinische coccidiose kunnen ontstaan, die behandeling met antibiotica nodig maken. Daarnaast is er een categorie coccidiostatica die naast een anticoccidiose-effect ook een antibacterieel effect heeft. Vanwege dat laatste is het niet ondenkbaar dat deze categorie binnen afzienbare tijd niet meer toegelaten is voor gebruik in pluimvee (M'Sadeq et al., 2015). Dat zou de mogelijkheden om coccidiose te voorkomen enorm beperken. Coccidiostatica zijn niet toegelaten bij legpluimvee.

Vaccinatie kan ook een manier zijn om coccidiose te voorkomen (Mot et al., 2014), maar heeft ook een groot nadeel. Een dergelijk vaccin bestaat namelijk uit levende (verzwakte) parasieten. Dat betekent dat er juist een risico kan zijn op coccidiose (of NE als secundaire infectie) en slechtere productieprestaties (Lee et al., 2011).

Necrotische enteritis is een darmontsteking met weefselversterf bij vleeskuikens en wordt veroorzaakt door de Grampositieve, sporevormende bacterie *Clostridium perfringens*, die gewoonlijk gevonden wordt in de blindedarmen van gezond pluimvee. De bacterie kan tot ziekteverschijnselen leiden als een toxineproducerende stam van *C. perfringens* aanslaat in andere delen van de darm. De kans daarop wordt aanzienlijk vergroot bij verminderde darmgezondheid, bijvoorbeeld door stress, voedingsfactoren, immunosuppressie, mycotoxicose of coccidiose.

NE roept een acute fase respons op die een reductie veroorzaakt in de voeropname en een toename in de afbraak van spierweefsel. De klinische verschijnselen bij de acute vorm zijn bloederige mest en uitval die kan oplopen tot 50%. Bij sectie worden ernstige darmbeschadigingen gevonden. In de subklinische vorm zijn de kuikens traag en vertonen een achterblijvende productie (m.n. verlaagde voeropname en groei), maar de sterfte hoeft niet verhoogd te zijn; het koppel wordt ongelijkmatig. Vroege verschijnselen van NE zijn natte mest, diarree en nat strooisel. Zowel in de acute vorm als in de subklinische vorm kan het percentage afkeuringen bij de slacht als gevolg van leverafwijkingen hoog zijn (Løvland en Kaldhusdal, 1999). De leverafwijkingen worden veroorzaakt door toxines die door *C. perfringens* geproduceerd worden. NE maakt de behandeling met antibiotica noodzakelijk.

Door de problematiek met resistentie tegen coccidiostatica, het wegvallen van antimicrobiële groeibevorderaars (AMGB's) – waarmee een aantal van deze ziektes onder controle gehouden kon worden - en de steeds striktere regelgeving om het therapeutische gebruik van antibiotica te beperken, wordt de vraag naar nieuwe, effectieve middelen en strategieën steeds groter. Dit kunnen (oraal

toegepaste) farmaceutische middelen zijn, maar ook alternatieven zoals organische zuren, plantenextracten, probiotica, prebiotica, mineralen, kruiden, specerijen, etherische oliën en immunostimulanten (Huygebaert et al., 2011). Het werkingsmechanisme van deze alternatieven is zeer divers, en omvat effecten als immuunmodulatie (bijv. door betaglucanen in veevoedergrondstoffen en/of additieven), ontstekingsremming (bijv. door flavonoïden in plantextracten), antioxidant activiteit (Quiroz-Castañeda & Dantán-González, 2015), antibacteriële activiteit (bijv. door organische zuren), verbetering van de verteerbaarheid, verbetering van de darmintegriteit, het bewerkstelligen van een stabiele microflora in de darm (bijv. door prebiotica), of versneld herstel na ziekte (Caly et al., 2015).

Samenvattend:

In dit project wordt het effect van farmaceutische en alternatieve middelen en voerstrategieën op darminfecties bij pluimvee onderzocht. De proeven worden uitgevoerd om darmschade te verminderen en/of herstel te bevorderen. Naast groei, voeropname en voederconversie zijn ook darmlaesies, bacterieprofielen van de darminhoud, immuunresponsen, histologische metingen, bacteriologisch onderzoek, etc. relevante uitleesparameters.

Referenties

Amerah, A.M., Ravindran, V., 2015. Effect of coccidian challenge and natural betaine supplementation on performance, nutrient utilization, and intestinal lesion scores of broiler chickens fed suboptimal level of dietary methionine. *Poult Sci.* 94:673-80.

Antonissen, G., Martel, A., Pasmans, F., et al., 2014. The impact of Fusarium mycotoxins on human and animal host susceptibility to infectious diseases. *Toxins.* 6:430-452.

Antonissen, G., Croubels, S., Pasmans, F., et al., 2015. Fumonisin affect the intestinal microbial homeostasis in broiler chickens, predisposing to necrotic enteritis. *Vet Res* 46:98.

Caly, D.L., D'Inca, R., Auclair, E., et al., 2015. Alternatives to antibiotics to prevent necrotic enteritis in broiler chickens: a microbiologist's perspective. *Front Microbiol.* 6:1336.

Huygebaert, G., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters. *Vet J.* 187:182-188.

Lee, J.T., Eckert, N.H., Ameiss, K.A., et al., 2011. The effect of dietary protein level on performance characteristics of coccidiosis vaccinated and nonvaccinated broilers following mixed-species Eimeria challenge. *Poult Sci* 90:1916-25.

Løvland, A. en Kaldhusdal, M., 1999. Liver lesions seen at slaughter as an indicator of necrotic enteritis in broiler flocks. *FEMS Immunological and Medical Microbiology* 24:345-351.

Mot, D., Timbermont, L., Haesebrouck, F., et al., 2014. Progress and problems in vaccination against necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Pathol.* 43:290-300.

M'Sadeq, S.A., Wu, S., Swick, R.A., et al., 2015. Towards the control of necrotic enteritis in broiler chickens with in-feed antibiotics phasing-out worldwide. *Anim Nutr.* 1:1-11.

Quiroz-Castañeda, R.E., Dantán-González, E., 2015. Control of avian coccidiosis: future and present natural alternatives. *Biomed Res Int.* [Epub ahead of print]

Stanley, D., Wu, S.B., Rodgers, N., et al., 2014. Differential responses of cecal microbiota to fishmeal,

Eimeria and Clostridium perfringens in a necrotic enteritis challenge model in chickens. PLoS One. 9:e104739.

Timbermont, L., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., et al., 2011. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. Avian Pathol 40:341-347.

www.veearts.nl/dierziekten/coccidiose-pluimvee/

www.worldpoultry.net

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

4. 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?
5. In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het doel van het project is het onderzoeken van manieren om de effecten van darminfecties bij pluimvee te verminderen en/of het herstel te bevorderen. Enkele voorbeelden van onderzoeksvragen die hierbij aan bod kunnen komen, zijn:

- Wat is het effect van het testproduct of de voerstrategie op zoötechnische prestaties bij pluimvee onder infectieuze omstandigheden?
- Wat is het effect van het testproduct of de voerstrategie op gezondheidsparameters bij pluimvee onder infectieuze omstandigheden?
- Wat is de optimale dosering van het testproduct?
- Hoe presteert het testproduct ten opzichte van een competitor product?

Haalbaarheid

De kans dat bovenstaande onderzoeksvraag binnen de looptijd van het project wordt beantwoord is zeer groot. Het instituut is een onafhankelijk privaat kennis- en informatiecentrum voor diervoeding en heeft de beschikking over eigen onderzoeksfaciliteiten en expertise om bovenstaande onderzoeksvragen te beantwoorden, evenals specifieke en gestandaardiseerde modellen om milde infecties na te bootsen. Vanwege de onafhankelijke positie voert het instituut regelmatig onderzoek op dit gebied uit, en heeft dan ook zeer veel ervaring met het uitvoeren van dit type studies.

Beschikbare expertises zijn kennis van dierfysiologie, darmgezondheid, microbiologie, grondstoffen, voeradditieven, ervaring met het uitvoeren van infectieproeven en de daarbij behorende eisen aan monsternamen.

Het instituut heeft dierfaciliteiten en specifieke en gestandaardiseerde modellen die geschikt zijn voor het uitvoeren van de onderzoeksvragen in dit project. Het instituut heeft een vaste groep onderzoekers in dienst die bijna allemaal een Ir-, MSc- of PhD- titel bezitten. Ook de dierverzorgers en overige proefbegeleiders bestaan uit een vaste groep medewerkers met veel ervaring in het verzorgen van (proef)dieren, het verzamelen van monsters en ander biologisch materiaal ter beantwoording van de onderzoeksvragen, evenals het verzamelen en verwerken van proefdata. Bovendien werken meerdere onderzoekers aan deze projecten, waardoor de voortgang van het project is gewaarborgd.

3.3 Belang

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

De maatschappij hecht grote waarde aan thema's zoals voedselveiligheid, antibioticareductie, dierwelzijn en milieu. Infectieziekten zijn een bedreiging voor deze thema's. De proeven die onder dit project worden uitgevoerd, dragen bij aan het voorkómen en/of bestrijden van infectieziekten, en hebben

daarom naast een direct positief effect op de gezondheid van het dier ook een maatschappelijke impact. Er is een voortdurende ontwikkeling gaande naar (genees)middelen of alternatieven die preventief of therapeutisch ingezet kunnen worden om de diergezondheid te verbeteren. Soms worden bestaande componenten waarvan de effectiviteit al is aangetoond verder verbeterd, waardoor bijvoorbeeld een lagere dosering of een kortere behandelduur volstaat, of waardoor de technologische toepassing verbetert (bijvoorbeeld betere hitteresistentie voor toepassing in gepelleteerde voeders). Het belang van dit project is het onderzoeken van de effectiviteit van deze nieuwe en/of verbeterde middelen en voerconcepten.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Proeven die onder dit project vallen, zijn meestal losstaande proeven die op basis van contractresearch worden uitgevoerd. De diercategorie en de frequentie waarmee de proeven worden uitgevoerd, evenals het type testproduct of de voerstrategie die onderzocht wordt, hangen af van de vraag van de klant. Dit project omvat de diersoort pluimvee met daarbinnen de categorie vleeskuikens.

Het contractresearch betreft projecten die op aanvraag van de farmaceutische industrie of toeleveranciers van de mengvoerindustrie uitgevoerd worden. De producten die onderzocht worden, zijn doorgaans in een ontwikkelings- of verbeterfase, maar er kunnen ook vergelijkende studies worden uitgevoerd waarin meerdere testproducten tegelijkertijd worden getest en onderling vergeleken. Het contractresearch kenmerkt zich door kortlopende projecten. Samen met de opdrachtgever wordt door de onderzoekers van het instituut een proefopzet vastgesteld.

Voorafgaand aan de uitvoering worden de volgende items op een rij gezet om tot de beste proefopzet te komen:

- Binnen welke categorie valt het testproduct (bijv. farmaceutisch product, organisch zuur, probioticum, etc.).
- Wat is het werkingsmechanisme van het testproduct en welk infectiemodel past daar het beste bij.
- Hoe dient het testproduct verwerkt of verstrekt te worden (via gepelleteerd voer, ongepelleteerd voer, drinkwater, orale inoculatie, sprayvaccinatie, etc.) en in welke dosering(en).
- Welke responsparameters (naast groei, voeropname en voederconversie) worden beïnvloed door het additief of de voerstrategie.
- Welk type monster is nodig om de vorige onderzoeksvraag te beantwoorden (bijv. bloed, weefsel, etc.).

Informatie over deze items wordt gezocht in de literatuur, gebaseerd op kennis en ervaring van de onderzoeker, gebaseerd op informatie van de toeleverancier of een pilotstudie, en/of gebaseerd op *in vitro* onderzoek.

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

Studies met infectiemodellen worden uitgevoerd in faciliteiten die voor dit doel geschikt zijn. De proefperiode is afhankelijk van het doeldier en het gekozen infectiemodel. De details staan in de bijlages.

Proeven onder deze projectaanvraag bestaan uit 3 tot 8 behandelingen en zijn, afhankelijk van het proefdoel, zodanig opgezet dat er getoetst kan worden op behandelingseffecten, maar ook op het toetsen van hoofdeffecten en interacties tussen type testproduct en dosering. In alle proeven worden standaard de productieparameters (groei, voeropname, voederconversie, uitval, etc.) gemeten. Daarnaast worden afhankelijk van het werkingsmechanisme van het testproduct en het gekozen infectiemodel specifieke uitleesparameters onderzocht, zoals darmlaesies, bacteriologische uitscheiding, immuunparameters, darmbacterieprofielen, etc.

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.

De proeven in dit project zijn niet onderling gerelateerd en staan in principe los van elkaar. Ze worden uitgevoerd in kortlopende projecten. Door de ruime ervaring met diverse categorieën testproducten zijn de onderzoekers binnen het instituut in staat om opdrachtgevers voorafgaand aan een proef goed te adviseren over welk type infectiemodel het meest geschikt is, welke analyses wel of niet relevant of haalbaar zijn, en welke monsternamemomenten het meest geschikt zijn.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	infectiemodel coccidiose
2	infectiemodel necrotische enteritis
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--------------------------|
| 1 | Infectiemodel coccidiose |

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 proef is het onderzoeken van farmaceutische of alternatieve middelen of voerstrategieën om coccidiose te voorkomen of te verminderen en/of het herstel na coccidiose te verbeteren. Coccidiose wordt veroorzaakt door Eimeria parasieten.

Eimeria spp. heeft een complexe levenscyclus. Nadat een oöcyste is uitgescheiden, moet deze eerst onder invloed van vocht en warmte in het strooisel sporuleren. Een gesporuleerde oöcyste is het infectieuze stadium. Als deze wordt opgenomen door een kip, komen de parasieten vrij in de darm en dringen daar de darmcellen binnen. In de darmcellen ontwikkelen de parasieten zich verder, totdat ze op een gegeven moment uit de cel barsten. De parasieten dringen dan weer nieuwe darmcellen binnen voor het volgende stadium van hun ontwikkeling totdat ze weer uit de darmcel barsten. Na het doorlopen van een aantal van deze aseksuele ontwikkelingsstadia is er een seksueel stadium waarbij een zygote gevormd wordt. Na omhulling met een celwand wordt gesproken over een oöcyste. Deze oöcyste wordt met de mest uitgescheiden, en de cyclus kan opnieuw beginnen. De periode tussen opname van een gesporuleerde oöcyste en uitscheiding van de nieuwe generatie oöcysten is afhankelijk van de Eimeria species, en kan variëren tussen 4 en 7 dagen. Het algemene klinische beeld van coccidiose is: slome kuikens, ruig verenkled, slechte uniformiteit in het koppel, natte mest (soms bloederig), onverteerde voerdeeltjes in de mest en slechte groei. Bij sectie van zieke dieren wordt darmschade gevonden.

De belangrijkste Eimeria species voor vleeskuikens staan hieronder genoemd:

- *E. acervulina* is de minst pathogene species, beschadigt voornamelijk het epitheel in het duodenum en heeft een hoge oöcysten-productie. Er is geen tot weinig uitval, maar er is vooral slechtere groei en voederconversie.
- *E. maxima* beschadigt voornamelijk de epitheelcellen van het duodenum en jejunum, produceert

minder oöcysten dan *E. acervulina*, maar kan wel uitval veroorzaken en veel economische schade als gevolg van slechtere groei en voederconversie.

- *E. tenella* beschadigt het epitheel van de blindedarmen, wat dusdanig ernstig kan zijn dat bloederige mest uitgescheiden wordt. De sterfte kan bij een klinische *E. tenella* infectie hoog zijn.

Het coccidiose-infectiemodel wordt vrijwel altijd uitgevoerd in vleeskuikens als doeldier. De infectie wordt opgewekt door orale inoculatie van gesporuleerde *Eimeria* oöcysten.

In de praktijk blijft coccidiose meestal niet beperkt tot één *Eimeria* species. Daarom wordt in het model gekozen voor een menginfectie van de drie hierboven genoemde species, waarbij rekening gehouden wordt met het verschil in pathogeniciteit. Er zijn twee aanpakken mogelijk:

1. Alle dieren in een experimentele eenheid worden geïnoculeerd. Het doel hiervan is dat het verloop van de infectie volledig gecontroleerd wordt, want alle dieren bevinden zich op zeker moment in ongeveer hetzelfde stadium van infectie of herstel.
2. Slechts enkele dieren in een experimentele eenheid worden geïnoculeerd. De geïnoculeerde dieren gaan na ongeveer een week de nieuwe generatie oöcysten uitscheiden die opgenomen kunnen worden door de contactdieren binnen de experimentele eenheid. Een dergelijk transmissie-experiment heeft als doel om een veldinfectie zoveel mogelijk na te bootsen.

Het is afhankelijk van het type testproduct of de onderzoeksvraag welk van beide aanpakken het meest geschikt is. Aanpak 1 is vooral geschikt voor een Proof of Principle of voor een onderzoeksvraag waarbij de variatie in productiestatistieken binnen een experimentele eenheid zo klein mogelijk moet zijn. Aanpak 2 is juist geschikt voor testproducten en onderzoeksvragen waarbij de praktijksituatie het uitgangspunt is, namelijk variatie binnen de contactdieren in een experimentele eenheid wat betreft het tijdstip van besmetting en de infectieuze dosis die het dier uit de omgeving opneemt. Aanpak 2 zal over het algemeen tot meer variatie in productiestatistieken binnen een experimentele eenheid leiden dan aanpak 1.

Een proefopzet heeft altijd tenminste een positieve controle - namelijk een geïnfecteerde groep die geen testproduct ontvangt- en een negatieve (niet-geïnfecteerde) controle die ook geen testproduct ontvangt. Een negatieve controlegroep wordt oraal geïnoculeerd met phosphate buffered saline - PBS - in plaats van *Eimeria spp.* Daarnaast zijn er 1 tot 6 proefgroepen die geïnfecteerd worden en die een testproduct in voer of water ontvangen.

Uitkomstparameters:

Technische resultaten: voeropname, groei, voederconversie en uitval.

Mestparameters: tellen van oöcysten in de mest (OPG = oöcysten per gram).

Bloedmonsters: o.a. klinisch-chemische parameters, hematologische parameters, antilichamanalyses, acute fase eiwitten.

Weefsels: o.a. het scoren van darmlaesies en het verzamelen van darmweefsel voor histologie.

Post-mortem beoordeling: o.a. om eventuele afwijkingen op orgaaniveau te beoordelen.

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.

Op dag 0 worden de kuikens bij aankomst per hok gewogen.

Aanpak 1: alle dieren in de proef worden rond dag 18 oraal geïnoculeerd met gesporuleerde oöcysten (of met PBS in de negatieve controle) in een volume van ca. 1 ml. Inoculatie duurt ongeveer 3 seconden per dier.

Aanpak 2: ongeveer 20% van het aantal dieren in een experimentele eenheid wordt rond dag 10 oraal geïnoculeerd met gesporuleerde oöcysten (of met PBS in de negatieve controle) in een volume van ongeveer 1 ml. Inoculatie duurt ongeveer 15 seconden per dier. Dit zijn seeder dieren. Deze dieren worden gemerkt met een vleugelmerk of pootring. De overige 80% zijn contactdieren, die de infectie na ongeveer een week via de natuurlijke route (namelijk via geïnfecteerde mest) van de geïnoculeerde dieren oppikken. De contactdieren worden dus rond dag 17-18 geïnfecteerd. Op deze manier sluiten beide aanpakken weer op elkaar aan.

De dieren worden dagelijks gecontroleerd op algemene gezondheid en bijzonderheden. De proef duurt tot de gebruikelijke slachtleeftijd voor vleeskuikens (35-42 dagen). Afhankelijk van het aantal voerfasen worden

de dieren minstens twee keer gewogen (meestal bij een voerovergang en aan het eind van de proef, bijvoorbeeld rond dag 21 en dag 35). Bij de weging worden alle kuikens in een hok opgepakt en in een krat gezet, per krat gewogen, en weer terug in het hok gezet. Een weging duurt ongeveer 2 minuten per hok.

Na inoculatie wordt per experimentele eenheid wekelijks mest verzameld voor OPG.

Bij aanpak 1 worden rond dag 6 na inoculatie 3 dieren random geselecteerd en geëuthanaseerd om darmlaesies te scoren. Deze procedure wordt na een week nog eens herhaald.

Bij aanpak 2 worden rond dag 6 na inoculatie 2 seeders random geselecteerd en geëuthanaseerd om darmlaesies te scoren. Op 7 en 14 dagen na deze procedure worden 3 contactdieren random geselecteerd en geëuthanaseerd om darmlaesies te scoren.

Bij de dieren waarbij darmlaesies gescoord worden, kan tegelijkertijd bloed of (darm)weefsel afgenomen worden voor aanvullend onderzoek.

Afhankelijk van het type additief is in sommige gevallen een extra monsternamen nodig voor een aanvullende evaluatie van behandelingseffecten. Dit geldt bijvoorbeeld voor de kinetiek van antilichaamresponsen. Bloedafname duurt ongeveer 30 seconden per dier. Deze extra handeling wordt uitgevoerd bij maximaal 3 random geselecteerde dieren per hok op maximaal twee tijdstippen (eenmaal per week).

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

Het aantal dieren is gebaseerd op het aantal herhalingen dat volgens een poweranalyse op een relevante parameter nodig is. Dit kan per additief of voersamenstelling verschillen. Het protocol moet voldoende gevoelig zijn om enig effect van deze omvang te detecteren en moet voldoende statistische power hebben om te garanderen dat het experimentele protocol voldoet aan het proefdoel. ANOVA en Fisher's LSD worden gebruikt om op behandelingseffecten te toetsen.

Significante verschillen moeten aangetoond worden op een niveau van tenminste $P \leq 0,05$. Daarvoor wordt de volgende input gebruikt:

- Gewenst aan te tonen relevant verschil
- Residual mean square (gebaseerd op eerdere proeven of op informatie uit de literatuur)
- Tweezijdige test
- Overschrijdingskans = 0.05
- Power = 0.80

Van de te onderzoeken teststoffen wordt een positief effect verwacht bij geïnfecteerde dieren. Dat is vaak gebaseerd op antibacteriële effecten gericht tegen een micro-organisme. Dit kan een gunstig effect hebben op de ernst van eventuele darmschade, en zou ervoor kunnen pleiten om eenzijdig te toetsen. Van sommige teststoffen is echter bekend dat ze een negatief effect kunnen hebben op productieprestaties. Dit is bijvoorbeeld het geval met bepaalde fytoenen, die weliswaar een antibacterieel effect kunnen hebben, maar ook een bittere smaak. Dit kan een negatief effect hebben op de voeropname, en daardoor op de groei en/of het herstel na de infectie. Daarom wordt tweezijdig getoetst.

B. De dieren

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

Diersoort: Kippen (vleeskuikens). Coccidioseproeven worden meestal uitgevoerd met hanen, vanwege hun snellere groei en hogere efficiëntie in vergelijking met hennen. De kuikens worden bij de broederij gesekest, zodat alleen kuikens van het gewenste geslacht worden aangeleverd bij het instituut.

Herkomst: Niet geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf (Nederlandse broederij)

Levensstadia: De kuikens komen als ééndagskuikens aan en doorlopen een standaard productieperiode van 35 tot 42 dagen.

Geschatte aantallen:

Aanpak 1: de proef start met 20 kuikens per proefeenheid.

Aanpak 2: de proef start met 22 kuikens per proefeenheid.

Het verschil in startaantal wordt verklaard door het extra sectiemoment bij Aanpak 2.

Met de aanname dat alle proeven volgens Aanpak 2 worden uitgevoerd, zijn er per proef naar schatting 8

behandelingen x 6 herhalingen x 22 = 1056 dieren. Naar schatting worden per jaar maximaal 3 proeven uitgevoerd. Bij een looptijd van het project van 5 jaar zijn dit maximaal 5 x 3 x 1056 = 15840 vleeskuikens.

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 additieven worden in het eerste stadium van hun ontwikkelingstraject met *in vitro* methodes onderzocht om een specifiek werkingsmechanisme aan te tonen. De effectiviteit in een complex en dynamisch organisme als een dier is echter van een geheel andere orde dan een *in vitro* methode onder gestandaardiseerde omstandigheden in een lab. Dit geldt in het bijzonder voor een parasiet als Eimeria, die een complexe levenscyclus heeft die moeilijk *in vitro* is na te bootsen.

Een additief krijgt in het dier te maken met zeer wisselende pH's in diverse darmsegmenten, met interacties met voercomponenten, met een endogene microflora, met verteringsenzymen, etc. Niet zelden blijken additieven die *in vitro* al in een lage dosering zeer effectief waren, *in vivo* veel minder effectief te zijn, of veel hoger gedoseerd te moeten worden om effectief te zijn. Een hogere dosering van sommige additieven kan echter leiden tot onsmakelijk voer, met als gevolg een lage voeropname en slechte groei. Daarnaast is de verwerking van het additief in het voer ook wezenlijk verschillend van de toepassing in een *in vitro* situatie. Denk bijvoorbeeld aan ontmenging en hittegevoeligheid bij gepelleteerde voeders.

Voor het testen van voerstrategieën geldt dat er geen vervangende *in vitro* technieken beschikbaar zijn. Coccidiose is een diersoortspecifieke ziekte. Om de effecten van additieven of voerstrategieën te kunnen testen, is daarom geen andere diersoort dan het doeldier mogelijk.

Vermindering

Met behulp van een poweranalyse op een relevante parameter (bijv. groei, voederconversie, darmlaesies, etc.) wordt bepaald welk aantal herhalingen nodig is voor beantwoording van de onderzoeksvraag. Waar mogelijk wordt hetzelfde dier gebruikt voor darmlaesiescores en monsternamen van bloed en/of weefsels, en waar mogelijk wordt hetzelfde monster gebruikt voor meerdere analyses.

Verfijning

De doseringen van Eimeria spp. zijn zodanig dat een milde coccidiose wordt beoogd, met effecten op productieprestaties, maar met zo min mogelijk darmschade, waardoor het ongerief wordt verkleind. Stress wordt tot een minimum beperkt door de dieren te laten hanteren door personeel dat ervaren is met het houden van diverse soorten pluimvee onder infectieuze omstandigheden.

Bloedafname wordt (waar mogelijk) uitgevoerd direct na euthanasie zodat dat geen extra ongerief oplevert.

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 handelingen worden snel en vakkundig door ervaren en gekwalificeerd personeel uitgevoerd. Dieren worden niet vaker of langer gehanteerd dan strikt noodzakelijk is.

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.

Door middel van literatuuronderzoek wordt beoordeeld of er sprake is van duplicatie. In wetenschappelijke publicaties worden echter vaak doseringen gebruikt die kostentechnisch niet haalbaar zijn voor de praktijk, of waarbij de voersamenstelling of de huisvesting niet praktijkconform is. Het kan daarom voorkomen dat proeven worden uitgevoerd volgens een opzet die gelijkenis vertoont met een al gepubliceerde proef, maar waarvan de randvoorwaarden of het proefdoel verschillen.

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.

Door de aard van de infectie kunnen de dieren (uitgezonderd de negatieve controle) verschijnselen van coccidiose laten zien, zoals sloomheid, natte mest en een lagere voeropname. Dit valt niet te voorkomen of veterinair te behandelen, omdat dat zou interfereren met de proefbehandelingen. Bij ernstige symptomen die geen uitzicht op verbetering geven, wordt een humaan eindpunt toegepast.

In gevallen waarbij bloedmonsters genomen moeten worden (als het niet in combinatie met euthanasie wordt uitgevoerd), kunnen de dieren pijn ervaren door het aanprikken van de ader. Dit is een kortdurende handeling en de pijn is relatief gering. Het toedienen van de verdoving zou evenveel ongerief opleveren als het afnemen van bloed. Daarom is besloten geen verdoving toe te passen.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1) Euthanasie
- 2) Inoculatie

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Euthanasie wordt uitgevoerd d.m.v. vergassing. Orale inoculatie veroorzaakt een onprettig gevoel.

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

Stress door hanteren wordt tot een minimum beperkt door deze handeling door ervaren en gekwalificeerd personeel uit te laten voeren. Voor inoculatie wordt spuitje met een speciale naald met rubberen stopje gebruikt, zodat er geen beschadigingen aan de bek en/of keelholte kunnen ontstaan. Het ongerief door euthanasie wordt zoveel mogelijk voorkomen door de juiste gasconcentraties toe te passen, waardoor het dier snel buiten bewustzijn raakt.

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.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De verwachte verschijnselen als gevolg van milde coccidiose (sloomheid, natte mest, lagere voeropname) duren meestal enkele dagen. Dieren die langer dan verwacht (meer dan 5 dagen) of ernstiger symptomen hebben dan een milde coccidiose (bijv. ernstige, bloederige diarree, apathisch gedrag, dier is niet aan te sporen tot beweging), hebben een humaan eindpunt bereikt en worden onmiddellijk geëuthanaseerd.

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

Vooraf de dieren in de positieve controle lopen kans deze criteria te halen. Dit is ongeveer 13% van het totaal aantal dieren.

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.

Het ongerief wordt geclassificeerd als matig. Het ongerief bij de negatieve controle wordt geclassificeerd als licht.

Het percentage dieren dat licht ongerief ondergaat, is gebaseerd op het aandeel dieren in de negatieve controle, die niet geïnfecteerd worden. Uitgaand van een situatie dat er 8 proefgroepen zijn (zie onderdeel B.), waarvan één groep de negatieve controle is, is dat 12.5% (afgerond 13%) van het aantal dieren.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Darmlaesies zijn een cruciale responsparameter. Om die te kunnen scoren, moet het dier geëuthanaseerd worden.

Coccidiose vormt geen risico voor de volksgezondheid. De overgebleven dieren zouden aan het eind van de proef in principe afgeleverd mogen worden aan het slachthuis. Aangezien het hier echter gaat om proefdieren die een experimentele infectie hebben doorgemaakt, is het niet gepast om de dieren in de voedselketen te laten komen. Daarom worden dieren aan het eind van de proef geëuthanaseerd.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|-------------------------------------|
| 2 | infectiemodel necrotische enteritis |

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 proef is het onderzoeken van farmaceutische of alternatieve middelen of voerstrategieën om necrotische enteritis (NE) te voorkomen of te verminderen en/of het herstel na NE te verbeteren. NE wordt veroorzaakt door toxineproducerende *Clostridium perfringens*. Dit is een Grampositieve bacterie die zich in de blindedarmen van pluimvee ophoudt. De bacterie veroorzaakt hier in principe geen schade. Onder bepaalde omstandigheden kan de bacterie uitgroeien op andere plaatsen in de darm, en veroorzaakt dan ernstige darmschade met weefselversterf. Een belangrijke predisponerende factor voor het laten aanslaan van *C. perfringens* is reeds aanwezige darmschade, bijvoorbeeld als gevolg van coccidiose. Ook een verhoogde viscositeit in de darm of een teveel aan onverteerd ruw eiwit zijn uitgesproken risicofactoren voor het ontstaan van NE. Een verhoogde viscositeit zorgt voor een langzamere passagesnelheid van de digesta. Daardoor is er een aanbod van nutriënten in de achterste delen van de darm, waar *C. perfringens* van kan profiteren. Een teveel aan onverteerd ruw eiwit wordt gefermenteerd door de microbiota in de darm. De fermentatieproducten die daarbij ontstaan beschadigen de darm.

De klinische verschijnselen bij de acute vorm zijn bloederige mest en sterfte, die in de praktijk kan oplopen tot 50%. De infectie roept een acute fase respons op die een reductie veroorzaakt in de voeropname en een toename in afbraak van spierweefsel. Bij sectie worden ernstige darmbeschadigingen gevonden. In de subklinische vorm zijn de kuikens traag en vertonen een achterblijvende productie (m.n. verlaagde voeropname en groei), maar de sterfte hoeft niet verhoogd te zijn; het koppel als geheel wordt ongelijkmatig.

Vroege verschijnselen van NE zijn natte mest, diarree en nat strooisel. Zowel in de acute vorm als in de subklinische vorm kan het percentage afkeuringen bij de slacht als gevolg van leverafwijkingen hoog zijn. Een uitbraak van NE maakt in de praktijk een behandeling met antibiotica noodzakelijk.

Aangezien NE een typische vleeskuikenziekte is, wordt het NE-infectiemodel altijd uitgevoerd in vleeskuikens als doeldier. De infectie wordt opgewekt door een combinatie van gesporuleerde *Eimeria* oöcysten en *C. perfringens* bacteriën.

Er zijn twee aanpakken mogelijk:

1. De testproducten worden onderzocht op de effecten op darmniveau en op productieprestaties. Dit betekent dat de dieren gedurende een periode van 35 tot 42 dagen worden gevolgd. Deze periode komt overeen met de praktijk.
2. De testproducten worden alleen onderzocht op de effecten op darmniveau. In dat geval duurt de proef 16 tot maximaal 21 dagen.

Het is afhankelijk van het type testproduct of de onderzoeksvraag welk van beide aanpakken het meest geschikt is.

Aanpak 1 is geschikt voor testproducten en onderzoeksvragen waarbij het effect op productieprestaties van primair belang is. Deze additieven beogen vaak al in de periode voorafgaand aan de infectie een zodanig effect op het dier en/of in de darm te hebben, dat de infectie minder gemakkelijk aanslaat, of waarbij het dier na de infectie sneller herstelt. Herstel betekent bij Aanpak 1 niet alleen herstel van de darmintegriteit, maar ook herstel van de voeropname en groei.

Aanpak 2 is vooral geschikt voor testproducten en onderzoeksvragen waarbij het effect op productieprestaties van ondergeschikt belang is. Vaak betreft dit additieven die een direct antiparasitair of antibacterieel effect hebben (direct gericht tegen grampositieve bacteriën in het algemeen of *C. perfringens* in het bijzonder). Herstel betekent bij Aanpak 2: primair herstel van darmintegriteit.

Een proefopzet heeft altijd tenminste een positieve controle - een geïnfecteerde groep die geen testproduct ontvangt- en een negatieve (niet-geïnfecteerde) controle die ook geen testproduct ontvangt. Daarnaast zijn er 1 tot 6 proefgroepen die geïnfecteerd worden en die een testproduct in voer of water ontvangen.

Uitkomstparameters:

Technische resultaten: voeropname, groei, voederconversie en uitval.

Mestparameters: o.a. bacteriologisch onderzoek.

Bloedmonsters: o.a. klinisch-chemische parameters, hematologische parameters, antilichaamanalyses, acute fase eiwitten.

Weefsels: o.a. het scoren van darmlaesies en het verzamelen van darmweefsel voor histologie.

Post-mortem beoordeling: o.a. om eventuele afwijkingen op orgaanniveau te beoordelen.

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.

Op dag 0 worden de kuikens bij aankomst per hok gewogen.

Rond dag 9 worden de dieren in de infectiebehandelingen oraal geïnoculeerd met gesporuleerde oöcysten van *E. maxima*. Dit wekt darmschade op in het jejunum, wat de juiste condities schept voor het laten aanslaan van *C. perfringens*. Dieren in de niet-geïnfecteerde behandelingen worden oraal geïnoculeerd met fysiologische zoutoplossing.

Ongeveer 5 dagen na de *E. maxima* inoculatie, dus rond dag 14, worden de dieren in de infectiebehandelingen oraal geïnoculeerd met *C. perfringens*. De dieren in de niet-geïnfecteerde behandelingen worden geïnoculeerd met steriele leverbouillon. De inoculaties duren ongeveer 3 seconden per dier.

Met dit protocol zijn de effecten van NE het duidelijkst zichtbaar op dag 15 en 16 (d.w.z. 1 en 2 dagen na *C. perfringens* inoculatie). Deze dagen zijn het meest indicatief om darmlaesiescores uit te voeren. Laesiescores worden uitgevoerd bij 4 dieren per proefeenheid per dag. In totaal worden er dus 8 dieren per proefeenheid gebruikt voor laesiescores.

Van de dieren die geëuthanaseerd worden om de laesiescores uit te voeren, kunnen tegelijkertijd andere monsters verzameld worden, zoals darminhoud voor analyse van de microbiota, darmweefsel voor histologie, bloed voor analyse op antilichamen of acute fase eiwitten, etc. Na dag 16 treedt herstel op. Dit is

af te lezen aan een toenemende voeropname en het verdwijnen van darmschade.

Afhankelijk van het type additief zijn in sommige gevallen op andere dagen dan dag 15 en 16 extra monsternames nodig voor een aanvullende evaluatie van behandelingseffecten. Dit geldt bijvoorbeeld voor het meten van de samenstelling van de microflora in de darm, het meten van de verteerbaarheid van voedingsstoffen tijdens en na de herstelfase, of de kinetiek van antilichaamresponsen. Voor het verzamelen van darmmonsters moet het dier geëuthanaseerd worden. Euthanasie of bloedafname duren ongeveer 30 seconden. Deze extra handelingen worden uitgevoerd bij maximaal 3 dieren per hok op maximaal vier tijdstippen. Vanaf inoculatie duurt het een kleine week voordat een antilichaamrespons meetbaar is. Het meten van antilichaamresponsen is bij NE proeven dus niet zinvol bij de dieren die worden geëuthanaseerd op dag 15 en 16 t.b.v. darmscores. Daarom worden de bloedmonsters bij andere dieren genomen als herhaalde waarneming. Dat wil zeggen: steeds dezelfde dieren worden bemonsterd met een tussenpoos van een week.

Afhankelijk van het aantal voerfases worden de dieren minstens twee keer gewogen (meestal bij een voerovergang en aan het eind van de proef, bijvoorbeeld rond dag 21 en dag 35). Bij de weging worden alle kuikens in een hok opgepakt en in een krat gezet, per krat gewogen, en weer terug in het hok gezet. Een weging duurt ongeveer 2 minuten per hok.

De periode vanaf de eerste inoculatie (op dag 9) tot aan dag 21 wordt beschouwd als de infectieuze periode. De dieren worden dan tijdelijk gehuisvest op roostervloeren. Dit is om ervoor te zorgen dat de dieren niet geherinfecteerd worden door de nieuwe generatie *Eimeria* oöcysten. Dit zou namelijk interfereren met de *C. perfringens* inoculatie op dag 14, waardoor de infectie ongecontroleerd zou verlopen. Daarvoor en daarna worden de dieren op strooisel gehuisvest.

De dieren worden dagelijks gecontroleerd op algemene gezondheid en bijzonderheden. De proef heeft een praktijkconforme productieperiode (35-42 dagen) als productieprestaties gedurende de herstelfase een belangrijke responsparameter zijn. Als dat niet het geval is, duurt de proef 16 tot maximaal 21 dagen.

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

Het aantal dieren is gebaseerd op het aantal herhalingen dat volgens een poweranalyse op een relevante parameter nodig is. Dit kan per additief of voersamenstelling verschillen. Het protocol moet voldoende gevoelig zijn om enig effect van deze omvang te detecteren en moet voldoende statistische power hebben om te garanderen dat het experimentele protocol voldoet aan het proefdoel. ANOVA en Fisher's LSD worden gebruikt om op behandelingseffecten te toetsen.

Significante verschillen moeten aangetoond worden op een niveau van tenminste $P \leq 0,05$. Daarvoor wordt de volgende input gebruikt:

- Gewenst aan te tonen relevant verschil
- Residual mean square (gebaseerd op eerdere proeven of op informatie uit de literatuur)
- Tweezijdige test
- Overschrijdingskans = 0.05
- Power = 0.80

Van de te onderzoeken teststoffen wordt een positief effect verwacht bij geïnfecteerde dieren. Dat is vaak gebaseerd op antibacteriële effecten gericht tegen een micro-organisme. Dit kan een gunstig effect hebben op de ernst van eventuele darmschade, en zou ervoor kunnen pleiten om eenzijdig te toetsen. Van sommige teststoffen is echter bekend dat ze een negatief effect kunnen hebben op productieprestaties. Dit is bijvoorbeeld het geval met bepaalde fytoenen, die weliswaar een antibacterieel effect kunnen hebben, maar ook een bittere smaak. Dit kan een negatief effect hebben op de voeropname, en daardoor op de groei en/of het herstel na de infectie. Daarom wordt tweezijdig getoetst.

B. De dieren

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

Diersoort: Kippen (vleeskuikens). Necrotische enteritis proeven worden meestal uitgevoerd met hanen, vanwege hun snellere groei en hogere efficiëntie in vergelijking met hennen. De kuikens worden bij de broederij gesekst, zodat alleen kuikens van het gewenste geslacht worden aangeleverd bij het instituut.

Herkomst: Niet geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf (Nederlandse broederij)

Levensstadia: De kuikens komen als ééndagskuiken aan en doorlopen een standaard productieperiode van 35 tot 42 dagen.

Geschatte aantallen:

Aanpak 1 (praktijkconforme productieperiode 35-42 dagen): de proef start met 20 eendagskuikens per proefeenheid.

Aanpak 2 (proefduur 16-21 dagen): de proef start met 10 eendagskuikens per proefeenheid.

Aanpak 1: er worden per proef naar schatting 8 behandelingen x 6 herhalingen x 20 = 960 dieren gebruikt. Naar schatting worden per jaar maximaal 3 proeven volgens deze opzet uitgevoerd. Bij een looptijd van het project van 5 jaar zijn dit maximaal $5 \times 3 \times 960 = 14400$ vleeskuikens.

Aanpak 2: er worden per proef naar schatting 8 behandelingen x 6 herhalingen x 10 = 480 dieren gebruikt. Naar schatting worden per jaar maximaal 2 proeven volgens deze opzet uitgevoerd. Bij een looptijd van het project van 5 jaar zijn dit maximaal $5 \times 2 \times 480 = 4800$ vleeskuikens.

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 additieven worden in het eerste stadium van hun ontwikkelingstraject met *in vitro* methodes onderzocht om een specifiek werkingsmechanisme aan te tonen. Testproducten die als doel hebben om NE te verminderen, hebben vaak als werkingsmechanisme een antibacteriële activiteit tegen *C. perfringens*. Dit is goed *in vitro* te onderzoeken. De effectiviteit van een testproduct in een complex en dynamisch organisme als een dier is echter van een geheel andere orde dan een *in vitro* methode onder gestandaardiseerde omstandigheden in een lab, zeker bij een ziekte als NE, die van meer factoren afhankelijk is dan alleen *C. perfringens*.

Een additief krijgt in het dier te maken met zeer wisselende pH's in diverse darmsegmenten, met interacties met voercomponenten, met een endogene microflora, met verteringsenzymen, etc. Niet zelden blijken additieven die *in vitro* al in een lage dosering zeer effectief waren, *in vivo* veel minder effectief te zijn, of veel hoger gedoseerd te moeten worden om effectief te zijn. Een hogere dosering van sommige additieven kan echter leiden tot onsmakelijk voer, met als gevolg een lage voeropname en slechte groei. Daarnaast is de verwerking van het additief in het voer ook wezenlijk verschillend van de toepassing in een *in vitro* situatie. Denk bijvoorbeeld aan ontmenging en hittegevoeligheid bij gepelleteerde voeders.

Voor het testen van voerstrategieën geldt dat er geen vervangende *in vitro* technieken beschikbaar zijn.

NE is een typische vleeskuikenziekte. Om de effecten van additieven of voerstrategieën te kunnen testen, is daarom geen andere diersoort dan het doeldier mogelijk.

Vermindering

Met behulp van een poweranalyse op een relevante parameter (bijv. groei, voederconversie, darmlaesies, etc.) wordt bepaald welk aantal herhalingen nodig is voor beantwoording van de onderzoeksvraag. Waar mogelijk wordt hetzelfde dier gebruikt voor darmlaesiescores en monsternamen van bloed en/of weefsels, en

waar mogelijk wordt hetzelfde monster gebruikt voor meerdere analyses.

Verfijning

Het model is in de loop der jaren verfijnd van drie keer inoculeren met *C. perfringens* naar één keer. In het verleden werden de dieren gedurende de gehele proefperiode op roostervloeren gehuisvest. In het huidige model worden de dieren gedurende slechts 12 dagen op roostervloeren gehuisvest.

Stress wordt tot een minimum beperkt door de dieren te laten hanteren door personeel dat ervaren is met het houden van diverse soorten pluimvee onder infectieuze omstandigheden.

Bloedafname wordt (waar mogelijk) uitgevoerd direct na euthanasie zodat dat geen extra ongerief oplevert.

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 handelingen worden snel en vakkundig door ervaren en gekwalificeerd personeel uitgevoerd. Dieren worden niet vaker of langer gehanteerd dan strikt noodzakelijk is.

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.

Door middel van literatuuronderzoek wordt beoordeeld of er sprake is van duplicatie. In wetenschappelijke publicaties worden echter vaak doseringen gebruikt die kostentechnisch niet haalbaar zijn voor de praktijk, of waarbij de voersamenstelling of de huisvesting niet praktijkconform is. Het kan daarom voorkomen dat proeven worden uitgevoerd volgens een opzet die gelijkenis vertoont met een al gepubliceerde proef, maar waarvan de randvoorwaarden of het proefdoel verschillen.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

De dieren worden bij aankomst gehuisvest op strooisel. Gedurende 12 dagen vanaf de eerste inoculatie worden de dieren op roostervloeren gehuisvest om herinfectie en een ongecontroleerd verloop van de infectie te voorkomen. Huisvesting op roostervloeren gaat ten koste van de mogelijkheid tot stofbaden, maar gemakkelijke toegang tot voer en water en ruimte om te lopen blijft bestaan.

Na deze periode worden de dieren weer op schoon strooisel gehuisvest tot aan het einde van de proef.

De bezettingsgraad voldoet aan de eisen voor proefdieren tot 36 dagen leeftijd. Het gros van de proeven zal niet langer duren dan 35 dagen. Een dergelijke groeiperiode komt redelijk overeen met de praktijk in Nederland. Er zijn echter regio's, zoals Italië en Spanje, waar het gebruikelijk is om vleeskuikens gedurende een langere groeiperiode aan te houden. In een enkel geval kan het dus voorkomen dat een opdrachtgever expliciet een langere groeiperiode wil. In die gevallen kan het voorkomen dat de bezetting gedurende korte tijd (van dag 37 tot dag 42) iets hoger is dan in de eisen voor proefdieren staat vermeld, namelijk niet de vereiste 0.21 m², maar 0.17 m² (alleen indien de dieren een gewicht van 2.4 kg overschrijden). Ondanks de iets hogere bezettingsgraad hebben de dieren dan nog steeds zeer gemakkelijk toegang tot water en voer, en nog steeds de ruimte om te lopen en te stofbaden.

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.

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

X Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Door de aard van de infectie kunnen de dieren (uitgezonderd de negatieve controle) verschijnselen van NE laten zien, zoals lusteloosheid, diarree, bol zitten en een lagere voeropname. Dit valt niet te voorkomen of veterinair te behandelen, omdat dat zou interfereren met de proefbehandelingen. Bij ernstige symptomen die geen uitzicht op verbetering geven, wordt een humaan eindpunt toegepast.

In gevallen waarbij bloedmonsters genomen moeten worden (als het niet in combinatie met euthanasie wordt uitgevoerd), kunnen de dieren pijn ervaren door het aanprikken van de ader. Dit is een kortdurende handeling en de pijn is relatief gering. Het toedienen van de verdoving zou evenveel ongerief opleveren als het afnemen van bloed. Daarom is besloten geen verdoving toe te passen.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1) Euthanasie
- 2) Inoculatie
- 3) Tijdelijke huisvesting op roostervloeren

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Euthanasie wordt uitgevoerd d.m.v. vergassing. Orale inoculatie veroorzaakt een onprettig gevoel. De tijdelijke huisvesting op roostervloeren is minder comfortabel dan huisvesting op strooisel.

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

Stress door hanteren wordt tot een minimum beperkt door deze handeling door ervaren en gekwalificeerd personeel uit te laten voeren. Voor inoculatie wordt spuitje met een speciale naald met rubberen stopje gebruikt, zodat er geen beschadigingen aan de bek en/of keelholte kunnen ontstaan. Het ongerief door euthanasie wordt zoveel mogelijk voorkomen door de juiste gasconcentraties toe te passen, waardoor het dier snel buiten bewustzijn raakt. Het ongerief door roosterhuisvesting wordt zoveel mogelijk beperkt door deze periode niet langer dan 12 dagen te laten duren en door aangepaste maaswijdtes te gebruiken, afhankelijk van de leeftijd van de dieren.

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.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De verschijnselen als gevolg van NE (sleme dieren, lage voeropname, natte mest), duren meestal 2 à 3

dagen. Daarna zet het herstel in, wat onder andere af te lezen is aan een stijgende lijn in de voeropname en een afname van de darmschade. Proeven met dit model hebben in het verleden laten zien dat 6 dagen na de *Clostridium* inoculatie de darmschade geheel verdwenen is.

Dieren waarbij op de 3e dag na de *Clostridium* inoculatie geen herstel is ingezet, of die ernstige symptomen hebben (bijv. ernstige, bloederige diarree, apathisch gedrag, dier is niet aan te sporen tot beweging) waar na 1 dag (dit is 2 dagen na *C. perfringens* inoculatie) geen verbetering in zit, hebben een humaan eindpunt bereikt en worden geëuthanaseerd.

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

Vooraf de dieren in de positieve controle lopen kans deze criteria te halen. Dit is ongeveer 13% van het totaal aantal dieren.

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.

Het ongerief wordt geclassificeerd als matig. Het ongerief bij de negatieve controle wordt geclassificeerd als licht.

Het percentage dieren dat licht ongerief ondergaat, is gebaseerd op het aandeel dieren in de negatieve controle, die niet geïnfecteerd worden. Uitgaand van een situatie dat er 8 proefgroepen zijn (zie onderdeel B.), waarvan één groep de negatieve controle is, is dat 12.5% (afgerond 13%) van het aantal dieren.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Darmlaesies zijn een cruciale responsparameter. Om die te kunnen scoren, moet het dier geëuthanaseerd worden.

NE is geen risico voor de volksgezondheid. De overgebleven dieren zouden aan het eind van de proef in principe afgeleverd mogen worden aan het slachthuis, hoewel er een kans bestaat op afkeur door leverafwijkingen. Daarnaast gaat het hier om proefdieren die een experimentele infectie hebben doorgemaakt. Daarom is het niet gepast om de dieren in de voedselketen te laten komen, en worden de dieren aan het eind van de proef geëuthanaseerd en vernietigd.

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.

X Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--------------------------|
| 1 | Infectiemodel coccidiose |

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 proef is het onderzoeken van farmaceutische of alternatieve middelen of voerstrategieën om coccidiose te voorkomen of te verminderen en/of het herstel na coccidiose te verbeteren. Coccidiose wordt veroorzaakt door *Eimeria* parasieten.

Eimeria spp. heeft een complexe levenscyclus. Nadat een oöcyste is uitgescheiden, moet deze eerst onder invloed van vocht en warmte in het strooisel sporuleren. Een gesporuleerde oöcyste is het infectieuze stadium. Als deze wordt opgenomen door een kip, komen de parasieten vrij in de darm en dringen daar de darmcellen binnen. In de darmcellen ontwikkelen de parasieten zich verder, totdat ze op een gegeven moment uit de cel barsten. De parasieten dringen dan weer nieuwe darmcellen binnen voor het volgende stadium van hun ontwikkeling totdat ze weer uit de darmcel barsten. Na het doorlopen van een aantal van deze aseksuele ontwikkelingsstadia is er een seksueel stadium waarbij een zygote gevormd wordt. Na omhulling met een celwand wordt gesproken over een oöcyste. Deze oöcyste wordt met de mest uitgescheiden, en de cyclus kan opnieuw beginnen. De periode tussen opname van een gesporuleerde oöcyste en uitscheiding van de nieuwe generatie oöcysten is afhankelijk van de *Eimeria* species, en kan variëren tussen 4 en 7 dagen. Het algemene klinische beeld van coccidiose is: slome kuikens, ruig verenkled, slechte uniformiteit in het koppel, natte mest (soms bloederig), onverteerde voerdeeltjes in de mest en slechte groei. Bij sectie van zieke dieren wordt darmschade gevonden.

De belangrijkste *Eimeria* species voor vleeskuikens staan hieronder genoemd:

- *E. acervulina* is de minst pathogene species, beschadigt voornamelijk het epitheel in het duodenum en heeft een hoge oöcysten-productie. Er is geen tot weinig uitval, maar er is vooral slechtere groei en voederconversie.
- *E. maxima* beschadigt voornamelijk de epitheelcellen van het duodenum en jejunum, produceert

minder oöcysten dan *E. acervulina*, maar kan wel uitval veroorzaken en veel economische schade als gevolg van slechtere groei en voederconversie.

- *E. tenella* beschadigt het epitheel van de blindedarmen, wat dusdanig ernstig kan zijn dat bloederige mest uitgescheiden wordt. De sterfte kan bij een klinische *E. tenella* infectie hoog zijn.

Het coccidiose-infectiemodel wordt vrijwel altijd uitgevoerd in vleeskuikens als doeldier. De infectie wordt opgewekt door orale inoculatie van gesporuleerde *Eimeria* oöcysten.

In de praktijk blijft coccidiose meestal niet beperkt tot één *Eimeria* species. Daarom wordt in het model gekozen voor een menginfectie van de drie hierboven genoemde species, waarbij rekening gehouden wordt met het verschil in pathogeniciteit. Er zijn twee aanpakken mogelijk:

1. Alle dieren in een experimentele eenheid worden geïnoculeerd. Het doel hiervan is dat het verloop van de infectie volledig gecontroleerd wordt, want alle dieren bevinden zich op zeker moment in ongeveer hetzelfde stadium van infectie of herstel.
2. Slechts enkele dieren in een experimentele eenheid worden geïnoculeerd. De geïnoculeerde dieren gaan na ongeveer een week de nieuwe generatie oöcysten uitscheiden die opgenomen kunnen worden door de contactdieren binnen de experimentele eenheid. Een dergelijk transmissie-experiment heeft als doel om een veldinfectie zoveel mogelijk na te bootsen.

Het is afhankelijk van het type testproduct of de onderzoeksvraag welk van beide aanpakken het meest geschikt is. Aanpak 1 is vooral geschikt voor een Proof of Principle of voor een onderzoeksvraag waarbij de variatie in productiestatistieken binnen een experimentele eenheid zo klein mogelijk moet zijn. Aanpak 2 is juist geschikt voor testproducten en onderzoeksvragen waarbij de praktijksituatie het uitgangspunt is, namelijk variatie binnen de contactdieren in een experimentele eenheid wat betreft het tijdstip van besmetting en de infectieuze dosis die het dier uit de omgeving opneemt. Aanpak 2 zal over het algemeen tot meer variatie in productiestatistieken binnen een experimentele eenheid leiden dan aanpak 1.

Een proefopzet heeft altijd tenminste een positieve controle - namelijk een geïnfecteerde groep die geen testproduct ontvangt- en een negatieve (niet-geïnfecteerde) controle die ook geen testproduct ontvangt. Een negatieve controlegroep wordt oraal geïnoculeerd met phosphate buffered saline - PBS - in plaats van *Eimeria spp.* Daarnaast zijn er 1 tot 6 proefgroepen die geïnfecteerd worden en die een testproduct in voer of water ontvangen.

Uitkomstparameters:

Technische resultaten: voeropname, groei, voederconversie en uitval.

Mestparameters: tellen van oöcysten in de mest (OPG = oöcysten per gram).

Bloedmonsters: o.a. klinisch-chemische parameters, hematologische parameters, antilichamanalyses, acute fase eiwitten.

Weefsels: o.a. het scoren van darmlaesies en het verzamelen van darmweefsel voor histologie.

Post-mortem beoordeling: o.a. om eventuele afwijkingen op orgaaniveau te beoordelen.

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.

Op dag 0 worden de kuikens bij aankomst per hok gewogen.

Aanpak 1: alle dieren in de proef worden rond dag 18 oraal geïnoculeerd met gesporuleerde oöcysten (of met PBS in de negatieve controle) in een volume van ca. 1 ml. Inoculatie duurt ongeveer 3 seconden per dier.

Aanpak 2: ongeveer 20% van het aantal dieren in een experimentele eenheid wordt rond dag 10 oraal geïnoculeerd met gesporuleerde oöcysten (of met PBS in de negatieve controle) in een volume van ongeveer 1 ml. Inoculatie duurt ongeveer 15 seconden per dier. Dit zijn seeder dieren. Deze dieren worden gemerkt met een vleugelmerk of pootring. De overige 80% zijn contactdieren, die de infectie na ongeveer een week via de natuurlijke route (namelijk via geïnfecteerde mest) van de geïnoculeerde dieren oppikken. De contactdieren worden dus rond dag 17-18 geïnfecteerd. Op deze manier sluiten beide aanpakken weer op elkaar aan.

De dieren worden dagelijks gecontroleerd op algemene gezondheid en bijzonderheden. De proef duurt tot de gebruikelijke slachtleeftijd voor vleeskuikens (35-42 dagen). Afhankelijk van het aantal voerfasen worden

de dieren minstens twee keer gewogen (meestal bij een voerovergang en aan het eind van de proef, bijvoorbeeld rond dag 21 en dag 35). Bij de weging worden alle kuikens in een hok opgepakt en in een krat gezet, per krat gewogen, en weer terug in het hok gezet. Een weging duurt ongeveer 2 minuten per hok.

Na inoculatie wordt per experimentele eenheid wekelijks mest verzameld voor OPG.

Bij aanpak 1 worden rond dag 6 na inoculatie 3 dieren random geselecteerd en geëuthanaseerd om darmlaesies te scoren. Deze procedure wordt na een week nog eens herhaald.

Bij aanpak 2 worden rond dag 6 na inoculatie 2 seeders random geselecteerd en geëuthanaseerd om darmlaesies te scoren. Op 7 en 14 dagen na deze procedure worden 3 contactdieren random geselecteerd en geëuthanaseerd om darmlaesies te scoren.

Bij de dieren waarbij darmlaesies gescoord worden, kan tegelijkertijd bloed of (darm)weefsel afgenomen worden voor aanvullend onderzoek.

Afhankelijk van het type additief is in sommige gevallen een extra monsternamen nodig voor een aanvullende evaluatie van behandelingseffecten. Dit geldt bijvoorbeeld voor de kinetiek van antilichaamresponsen. Bloedafname duurt ongeveer 30 seconden per dier. Deze extra handeling wordt uitgevoerd bij maximaal 3 random geselecteerde dieren per hok op maximaal twee tijdstippen (eenmaal per week).

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

Het aantal dieren is gebaseerd op het aantal herhalingen dat volgens een poweranalyse op een relevante parameter nodig is. Dit kan per additief of voersamenstelling verschillen. Het protocol moet voldoende gevoelig zijn om enig effect van deze omvang te detecteren en moet voldoende statistische power hebben om te garanderen dat het experimentele protocol voldoet aan het proefdoel. ANOVA en Fisher's LSD worden gebruikt om op behandelingseffecten te toetsen.

Significante verschillen moeten aangetoond worden op een niveau van tenminste $P \leq 0,05$. Daarvoor wordt de volgende input gebruikt:

- Gewenst aan te tonen relevant verschil
- Residual mean square (gebaseerd op eerdere proeven of op informatie uit de literatuur)
- Tweezijdige test
- Overschrijdingskans = 0.05
- Power = 0.80

Van de te onderzoeken teststoffen wordt een positief effect verwacht bij geïnfecteerde dieren. Dat is vaak gebaseerd op antibacteriële effecten gericht tegen een micro-organisme. Dit kan een gunstig effect hebben op de ernst van eventuele darmschade, en zou ervoor kunnen pleiten om eenzijdig te toetsen. Van sommige teststoffen is echter bekend dat ze een negatief effect kunnen hebben op productieprestaties. Dit is bijvoorbeeld het geval met bepaalde fytoenen, die weliswaar een antibacterieel effect kunnen hebben, maar ook een bittere smaak. Dit kan een negatief effect hebben op de voeropname, en daardoor op de groei en/of het herstel na de infectie. Daarom wordt tweezijdig getoetst.

B. De dieren

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

Diersoort: Kippen (vleeskuikens). Coccidioseproeven worden meestal uitgevoerd met hanen, vanwege hun snellere groei en hogere efficiëntie in vergelijking met hennen. De kuikens worden bij de broederij gesekest, zodat alleen kuikens van het gewenste geslacht worden aangeleverd bij het instituut.

Herkomst: Niet geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf (Nederlandse broederij)

Levensstadia: De kuikens komen als ééndagskuikens aan en doorlopen een standaard productieperiode van 35 tot 42 dagen.

Geschatte aantallen:

Aanpak 1: de proef start met 20 kuikens per proefeenheid.

Aanpak 2: de proef start met 22 kuikens per proefeenheid.

Het verschil in startaantal wordt verklaard door het extra sectiemoment bij Aanpak 2.

Met de aanname dat alle proeven volgens Aanpak 2 worden uitgevoerd, zijn er per proef naar schatting 8

behandelingen x 6 herhalingen x 22 = 1056 dieren. Naar schatting worden per jaar maximaal 3 proeven uitgevoerd. Bij een looptijd van het project van 5 jaar zijn dit maximaal 5 x 3 x 1056 = 15840 vleeskuikens.

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 additieven worden in het eerste stadium van hun ontwikkelingstraject met *in vitro* methodes onderzocht om een specifiek werkingsmechanisme aan te tonen. De effectiviteit in een complex en dynamisch organisme als een dier is echter van een geheel andere orde dan een *in vitro* methode onder gestandaardiseerde omstandigheden in een lab. Dit geldt in het bijzonder voor een parasiet als Eimeria, die een complexe levenscyclus heeft die moeilijk *in vitro* is na te bootsen.

Een additief krijgt in het dier te maken met zeer wisselende pH's in diverse darmsegmenten, met interacties met voercomponenten, met een endogene microflora, met verteringsenzymen, etc. Niet zelden blijken additieven die *in vitro* al in een lage dosering zeer effectief waren, *in vivo* veel minder effectief te zijn, of veel hoger gedoseerd te moeten worden om effectief te zijn. Een hogere dosering van sommige additieven kan echter leiden tot onsmakelijk voer, met als gevolg een lage voeropname en slechte groei. Daarnaast is de verwerking van het additief in het voer ook wezenlijk verschillend van de toepassing in een *in vitro* situatie. Denk bijvoorbeeld aan ontmenging en hittegevoeligheid bij gepelleteerde voeders.

Voor het testen van voerstrategieën geldt dat er geen vervangende *in vitro* technieken beschikbaar zijn. Coccidiose is een diersoortspecifieke ziekte. Om de effecten van additieven of voerstrategieën te kunnen testen, is daarom geen andere diersoort dan het doeldier mogelijk.

Vermindering

Met behulp van een poweranalyse op een relevante parameter (bijv. groei, voederconversie, darmlaesies, etc.) wordt bepaald welk aantal herhalingen nodig is voor beantwoording van de onderzoeksvraag. Waar mogelijk wordt hetzelfde dier gebruikt voor darmlaesiescores en monsternamen van bloed en/of weefsels, en waar mogelijk wordt hetzelfde monster gebruikt voor meerdere analyses.

Verfijning

De doseringen van Eimeria spp. zijn zodanig dat een milde coccidiose wordt beoogd, met effecten op productieprestaties, maar met zo min mogelijk darmschade, waardoor het ongerief wordt verkleind. Stress wordt tot een minimum beperkt door de dieren te laten hanteren door personeel dat ervaren is met het houden van diverse soorten pluimvee onder infectieuze omstandigheden.

Bloedafname wordt (waar mogelijk) uitgevoerd direct na euthanasie zodat dat geen extra ongerief oplevert.

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 handelingen worden snel en vakkundig door ervaren en gekwalificeerd personeel uitgevoerd. Dieren worden niet vaker of langer gehanteerd dan strikt noodzakelijk is.

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.

Door middel van literatuuronderzoek wordt beoordeeld of er sprake is van duplicatie. In wetenschappelijke publicaties worden echter vaak doseringen gebruikt die kostentechnisch niet haalbaar zijn voor de praktijk, of waarbij de voersamenstelling of de huisvesting niet praktijkconform is. Het kan daarom voorkomen dat proeven worden uitgevoerd volgens een opzet die gelijkenis vertoont met een al gepubliceerde proef, maar waarvan de randvoorwaarden of het proefdoel verschillen.

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.

Door de aard van de infectie kunnen de dieren (uitgezonderd de negatieve controle) verschijnselen van coccidiose laten zien, zoals sloomheid, natte mest en een lagere voeropname. Dit valt niet te voorkomen of veterinair te behandelen, omdat dat zou interfereren met de proefbehandelingen. Bij ernstige symptomen die geen uitzicht op verbetering geven, wordt een humaan eindpunt toegepast.

In gevallen waarbij bloedmonsters genomen moeten worden (als het niet in combinatie met euthanasie wordt uitgevoerd), kunnen de dieren pijn ervaren door het aanprikken van de ader. Dit is een kortdurende handeling en de pijn is relatief gering. Het toedienen van de verdoving zou evenveel ongerief opleveren als het afnemen van bloed. Daarom is besloten geen verdoving toe te passen.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1) Euthanasie
- 2) Inoculatie

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Euthanasie wordt uitgevoerd d.m.v. vergassing. Orale inoculatie veroorzaakt een onprettig gevoel.

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

Stress door hanteren wordt tot een minimum beperkt door deze handeling door ervaren en gekwalificeerd personeel uit te laten voeren. Voor inoculatie wordt spuitje met een speciale naald met rubberen stopje gebruikt, zodat er geen beschadigingen aan de bek en/of keelholte kunnen ontstaan. Het ongerief door euthanasie wordt zoveel mogelijk voorkomen door de juiste gasconcentraties toe te passen, waardoor het dier snel buiten bewustzijn raakt.

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.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De verwachte verschijnselen als gevolg van milde coccidiose (sloomheid, natte mest, lagere voeropname) duren meestal enkele dagen. Dieren die langer dan verwacht (meer dan 5 dagen) of ernstiger symptomen hebben dan een milde coccidiose (bijv. ernstige, bloederige diarree, apathisch gedrag, dier is niet aan te sporen tot beweging), hebben een humaan eindpunt bereikt en worden onmiddellijk geëuthanaseerd.

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

Vooraf de dieren in de positieve controle lopen kans deze criteria te halen. Dit is ongeveer 13% van het totaal aantal dieren.

Een tijdige herkenning van humane eindpunten wordt geborgd door bij de dagelijkse controles dieren die bovenstaande ziekteverschijnselen vertonen een kleurmerk te geven. Elke dag van de week heeft een eigen kleurcode om dieren met milde symptomen te merken. Daarnaast wordt één kleur gereserveerd om dieren met ernstiger symptomen te merken. Op deze manier kunnen dieren met milde symptomen in de tijd gevolgd worden, en dieren met ernstiger symptomen snel geïdentificeerd worden. Bij de dierruimtes zijn werkvoorschriften aanwezig die helpen beslissen wanneer een humaan eindpunt is bereikt.

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.

Het ongerief wordt geclassificeerd als matig. Het ongerief bij de negatieve controle wordt geclassificeerd als licht.

Het percentage dieren dat licht ongerief ondergaat, is gebaseerd op het aandeel dieren in de negatieve controle, die niet geïnfecteerd worden. Uitgaand van een situatie dat er 8 proefgroepen zijn (zie onderdeel B.), waarvan één groep de negatieve controle is, is dat 12.5% (afgerond 13%) van het aantal dieren.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Darmlaesies zijn een cruciale responsparemetre. Om die te kunnen scoren, moet het dier geëuthanaseerd

worden.

Coccidiose vormt geen risico voor de volksgezondheid. De overgebleven dieren zouden aan het eind van de proef in principe afgeleverd mogen worden aan het slachthuis. Aangezien het hier echter gaat om proefdieren die een experimentele infectie hebben doorgemaakt, is het niet gepast om de dieren in de voedselketen te laten komen. Daarom worden dieren aan het eind van de proef geëuthanaseerd.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- | 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in. | 24600 | | | | |
|--|--|------------|----------------|---|-------------------------------------|
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Schothorst Feed Research B.V. | | | | |
| 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. | <table border="1"><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>infectiemodel necrotische enteritis</td></tr></tbody></table> | Volgnummer | Type dierproef | 2 | infectiemodel necrotische enteritis |
| Volgnummer | Type dierproef | | | | |
| 2 | infectiemodel necrotische enteritis | | | | |

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 proef is het onderzoeken van farmaceutische of alternatieve middelen of voerstrategieën om necrotische enteritis (NE) te voorkomen of te verminderen en/of het herstel na NE te verbeteren. NE wordt veroorzaakt door toxineproducerende *Clostridium perfringens*. Dit is een Grampositieve bacterie die zich in de blindedarmen van pluimvee ophoudt. De bacterie veroorzaakt hier in principe geen schade. Onder bepaalde omstandigheden kan de bacterie uitgroeien op andere plaatsen in de darm, en veroorzaakt dan ernstige darmschade met weefselversterf. Een belangrijke predisponerende factor voor het laten aanslaan van *C. perfringens* is reeds aanwezige darmschade, bijvoorbeeld als gevolg van coccidiose. Ook een verhoogde viscositeit in de darm of een teveel aan onverteerd ruw eiwit zijn uitgesproken risicofactoren voor het ontstaan van NE. Een verhoogde viscositeit zorgt voor een langzamere passagesnelheid van de digesta. Daardoor is er een aanbod van nutriënten in de achterste delen van de darm, waar *C. perfringens* van kan profiteren. Een teveel aan onverteerd ruw eiwit wordt gefermenteerd door de microbiota in de darm. De fermentatieproducten die daarbij ontstaan beschadigen de darm.

De klinische verschijnselen bij de acute vorm zijn bloederige mest en sterfte, die in de praktijk kan oplopen tot 50%. De infectie roept een acute fase respons op die een reductie veroorzaakt in de voeropname en een toename in afbraak van spierweefsel. Bij sectie worden ernstige darmbeschadigingen gevonden. In de subklinische vorm zijn de kuikens traag en vertonen een achterblijvende productie (m.n. verlaagde voeropname en groei), maar de sterfte hoeft niet verhoogd te zijn; het koppel als geheel wordt ongelijkmatig.

Vroege verschijnselen van NE zijn natte mest, diarree en nat strooisel. Zowel in de acute vorm als in de subklinische vorm kan het percentage afkeuringen bij de slacht als gevolg van leverafwijkingen hoog zijn. Een uitbraak van NE maakt in de praktijk een behandeling met antibiotica noodzakelijk.

Aangezien NE een typische vleeskuikenziekte is, wordt het NE-infectiemodel altijd uitgevoerd in vleeskuikens als doeldier. De infectie wordt opgewekt door een combinatie van gesporuleerde *Eimeria* oöcysten en *C. perfringens* bacteriën.

Er zijn twee aanpakken mogelijk:

1. De testproducten worden onderzocht op de effecten op darmniveau en op productieprestaties. Dit betekent dat de dieren gedurende een periode van 35 tot 42 dagen worden gevolgd. Deze periode komt overeen met de praktijk.
2. De testproducten worden alleen onderzocht op de effecten op darmniveau. In dat geval duurt de proef 16 tot maximaal 21 dagen.

Het is afhankelijk van het type testproduct of de onderzoeksvraag welk van beide aanpakken het meest geschikt is.

Aanpak 1 is geschikt voor testproducten en onderzoeksvragen waarbij het effect op productieprestaties van primair belang is. Deze additieven beogen vaak al in de periode voorafgaand aan de infectie een zodanig effect op het dier en/of in de darm te hebben, dat de infectie minder gemakkelijk aanslaat, of waarbij het dier na de infectie sneller herstelt. Herstel betekent bij Aanpak 1 niet alleen herstel van de darmintegriteit, maar ook herstel van de voeropname en groei.

Aanpak 2 is vooral geschikt voor testproducten en onderzoeksvragen waarbij het effect op productieprestaties van ondergeschikt belang is. Vaak betreft dit additieven die een direct antiparasitair of antibacterieel effect hebben (direct gericht tegen grampositieve bacteriën in het algemeen of *C. perfringens* in het bijzonder). Herstel betekent bij Aanpak 2: primair herstel van darmintegriteit.

Een proefopzet heeft altijd tenminste een positieve controle - een geïnfecteerde groep die geen testproduct ontvangt- en een negatieve (niet-geïnfecteerde) controle die ook geen testproduct ontvangt. Daarnaast zijn er 1 tot 6 proefgroepen die geïnfecteerd worden en die een testproduct in voer of water ontvangen.

Uitkomstparameters:

Technische resultaten: voeropname, groei, voederconversie en uitval.

Mestparameters: o.a. bacteriologisch onderzoek.

Bloedmonsters: o.a. klinisch-chemische parameters, hematologische parameters, antilichaamanalyses, acute fase eiwitten.

Weefsels: o.a. het scoren van darmlaesies en het verzamelen van darmweefsel voor histologie.

Post-mortem beoordeling: o.a. om eventuele afwijkingen op orgaanniveau te beoordelen.

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.

Op dag 0 worden de kuikens bij aankomst per hok gewogen.

Rond dag 9 worden de dieren in de infectiebehandelingen oraal geïnoculeerd met gesporuleerde oöcysten van *E. maxima*. Dit wekt darmschade op in het jejunum, wat de juiste condities schept voor het laten aanslaan van *C. perfringens*. Dieren in de niet-geïnfecteerde behandelingen worden oraal geïnoculeerd met fysiologische zoutoplossing.

Ongeveer 5 dagen na de *E. maxima* inoculatie, dus rond dag 14, worden de dieren in de infectiebehandelingen oraal geïnoculeerd met *C. perfringens*. De dieren in de niet-geïnfecteerde behandelingen worden geïnoculeerd met steriele leverbouillon. De inoculaties duren ongeveer 3 seconden per dier.

Met dit protocol zijn de effecten van NE het duidelijkst zichtbaar op dag 15 en 16 (d.w.z. 1 en 2 dagen na *C. perfringens* inoculatie). Deze dagen zijn het meest indicatief om darmlaesiescores uit te voeren. Laesiescores worden uitgevoerd bij 4 dieren per proefeenheid per dag. In totaal worden er dus 8 dieren per proefeenheid gebruikt voor laesiescores.

Van de dieren die geëuthanaseerd worden om de laesiescores uit te voeren, kunnen tegelijkertijd andere monsters verzameld worden, zoals darminhoud voor analyse van de microbiota, darmweefsel voor histologie, bloed voor analyse op antilichamen of acute fase eiwitten, etc. Na dag 16 treedt herstel op. Dit is

af te lezen aan een toenemende voeropname en het verdwijnen van darmschade.

Afhankelijk van het type additief zijn in sommige gevallen op andere dagen dan dag 15 en 16 extra monsternames nodig voor een aanvullende evaluatie van behandelingseffecten. Dit geldt bijvoorbeeld voor het meten van de samenstelling van de microflora in de darm, het meten van de verteerbaarheid van voedingsstoffen tijdens en na de herstelfase, of de kinetiek van antilichaamresponsen. Voor het verzamelen van darmmonsters moet het dier geëuthanaseerd worden. Euthanasie of bloedafname duren ongeveer 30 seconden. Deze extra handelingen worden uitgevoerd bij maximaal 3 dieren per hok op maximaal vier tijdstippen. Vanaf inoculatie duurt het een kleine week voordat een antilichaamrespons meetbaar is. Het meten van antilichaamresponsen is bij NE proeven dus niet zinvol bij de dieren die worden geëuthanaseerd op dag 15 en 16 t.b.v. darmscores. Daarom worden de bloedmonsters bij andere dieren genomen als herhaalde waarneming. Dat wil zeggen: steeds dezelfde dieren worden bemonsterd met een tussenpoos van een week.

Afhankelijk van het aantal voerfases worden de dieren minstens twee keer gewogen (meestal bij een voerovergang en aan het eind van de proef, bijvoorbeeld rond dag 21 en dag 35). Bij de weging worden alle kuikens in een hok opgepakt en in een krat gezet, per krat gewogen, en weer terug in het hok gezet. Een weging duurt ongeveer 2 minuten per hok.

De periode vanaf de eerste inoculatie (op dag 9) tot aan dag 21 wordt beschouwd als de infectieuze periode. De dieren worden dan tijdelijk gehuisvest op roostervloeren. Dit is om ervoor te zorgen dat de dieren niet geherinfecteerd worden door de nieuwe generatie *Eimeria* oöcysten. Dit zou namelijk interfereren met de *C. perfringens* inoculatie op dag 14, waardoor de infectie ongecontroleerd zou verlopen. Daarvoor en daarna worden de dieren op strooisel gehuisvest.

De dieren worden dagelijks gecontroleerd op algemene gezondheid en bijzonderheden. De proef heeft een praktijkconforme productieperiode (35-42 dagen) als productieprestaties gedurende de herstelfase een belangrijke responsparameter zijn. Als dat niet het geval is, duurt de proef 16 tot maximaal 21 dagen.

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

Het aantal dieren is gebaseerd op het aantal herhalingen dat volgens een poweranalyse op een relevante parameter nodig is. Dit kan per additief of voersamenstelling verschillen. Het protocol moet voldoende gevoelig zijn om enig effect van deze omvang te detecteren en moet voldoende statistische power hebben om te garanderen dat het experimentele protocol voldoet aan het proefdoel. ANOVA en Fisher's LSD worden gebruikt om op behandelingseffecten te toetsen.

Significante verschillen moeten aangetoond worden op een niveau van tenminste $P \leq 0,05$. Daarvoor wordt de volgende input gebruikt:

- Gewenst aan te tonen relevant verschil
- Residual mean square (gebaseerd op eerdere proeven of op informatie uit de literatuur)
- Tweezijdige test
- Overschrijdingskans = 0.05
- Power = 0.80

Van de te onderzoeken teststoffen wordt een positief effect verwacht bij geïnfecteerde dieren. Dat is vaak gebaseerd op antibacteriële effecten gericht tegen een micro-organisme. Dit kan een gunstig effect hebben op de ernst van eventuele darmschade, en zou ervoor kunnen pleiten om eenzijdig te toetsen. Van sommige teststoffen is echter bekend dat ze een negatief effect kunnen hebben op productieprestaties. Dit is bijvoorbeeld het geval met bepaalde fytoenen, die weliswaar een antibacterieel effect kunnen hebben, maar ook een bittere smaak. Dit kan een negatief effect hebben op de voeropname, en daardoor op de groei en/of het herstel na de infectie. Daarom wordt tweezijdig getoetst.

B. De dieren

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

Diersoort: Kippen (vleeskuikens). Necrotische enteritis proeven worden meestal uitgevoerd met hanen, vanwege hun snellere groei en hogere efficiëntie in vergelijking met hennen. De kuikens worden bij de broederij gesekest, zodat alleen kuikens van het gewenste geslacht worden aangeleverd bij het instituut.

Herkomst: Niet geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf (Nederlandse broederij)

Levensstadia: De kuikens komen als ééndagskuiken aan en doorlopen een standaard productieperiode van 35 tot 42 dagen.

Geschatte aantallen:

Aanpak 1 (praktijkconforme productieperiode 35-42 dagen): de proef start met 20 eendagskuikens per proefeenheid.

Aanpak 2 (proefduur 16-21 dagen): de proef start met 10 eendagskuikens per proefeenheid.

Aanpak 1: er worden per proef naar schatting 8 behandelingen x 6 herhalingen x 20 = 960 dieren gebruikt. Naar schatting worden per jaar maximaal 3 proeven volgens deze opzet uitgevoerd. Bij een looptijd van het project van 5 jaar zijn dit maximaal $5 \times 3 \times 960 = 14400$ vleeskuikens.

Aanpak 2: er worden per proef naar schatting 8 behandelingen x 6 herhalingen x 10 = 480 dieren gebruikt. Naar schatting worden per jaar maximaal 2 proeven volgens deze opzet uitgevoerd. Bij een looptijd van het project van 5 jaar zijn dit maximaal $5 \times 2 \times 480 = 4800$ vleeskuikens.

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 additieven worden in het eerste stadium van hun ontwikkelingstraject met *in vitro* methodes onderzocht om een specifiek werkingsmechanisme aan te tonen. Testproducten die als doel hebben om NE te verminderen, hebben vaak als werkingsmechanisme een antibacteriële activiteit tegen *C. perfringens*. Dit is goed *in vitro* te onderzoeken. De effectiviteit van een testproduct in een complex en dynamisch organisme als een dier is echter van een geheel andere orde dan een *in vitro* methode onder gestandaardiseerde omstandigheden in een lab, zeker bij een ziekte als NE, die van meer factoren afhankelijk is dan alleen *C. perfringens*.

Een additief krijgt in het dier te maken met zeer wisselende pH's in diverse darmsegmenten, met interacties met voercomponenten, met een endogene microflora, met verteringsenzymen, etc. Niet zelden blijken additieven die *in vitro* al in een lage dosering zeer effectief waren, *in vivo* veel minder effectief te zijn, of veel hoger gedoseerd te moeten worden om effectief te zijn. Een hogere dosering van sommige additieven kan echter leiden tot onsmakelijk voer, met als gevolg een lage voeropname en slechte groei. Daarnaast is de verwerking van het additief in het voer ook wezenlijk verschillend van de toepassing in een *in vitro* situatie. Denk bijvoorbeeld aan ontmenging en hittegevoeligheid bij gepelleteerde voeders.

Voor het testen van voerstrategieën geldt dat er geen vervangende *in vitro* technieken beschikbaar zijn.

NE is een typische vleeskuikenziekte. Om de effecten van additieven of voerstrategieën te kunnen testen, is daarom geen andere diersoort dan het doeldier mogelijk.

Vermindering

Met behulp van een poweranalyse op een relevante parameter (bijv. groei, voederconversie, darmlaesies, etc.) wordt bepaald welk aantal herhalingen nodig is voor beantwoording van de onderzoeksvraag. Waar mogelijk wordt hetzelfde dier gebruikt voor darmlaesiescores en monsternamen van bloed en/of weefsels, en

waar mogelijk wordt hetzelfde monster gebruikt voor meerdere analyses.

Verfijning

Het model is in de loop der jaren verfijnd van drie keer inoculeren met *C. perfringens* naar één keer. In het verleden werden de dieren gedurende de gehele proefperiode op roostervloeren gehuisvest. In het huidige model worden de dieren gedurende slechts 12 dagen op roostervloeren gehuisvest.

Stress wordt tot een minimum beperkt door de dieren te laten hanteren door personeel dat ervaren is met het houden van diverse soorten pluimvee onder infectieuze omstandigheden.

Bloedafname wordt (waar mogelijk) uitgevoerd direct na euthanasie zodat dat geen extra ongerief oplevert.

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 handelingen worden snel en vakkundig door ervaren en gekwalificeerd personeel uitgevoerd. Dieren worden niet vaker of langer gehanteerd dan strikt noodzakelijk is.

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.

Door middel van literatuuronderzoek wordt beoordeeld of er sprake is van duplicatie. In wetenschappelijke publicaties worden echter vaak doseringen gebruikt die kostentechnisch niet haalbaar zijn voor de praktijk, of waarbij de voersamenstelling of de huisvesting niet praktijkconform is. Het kan daarom voorkomen dat proeven worden uitgevoerd volgens een opzet die gelijkenis vertoont met een al gepubliceerde proef, maar waarvan de randvoorwaarden of het proefdoel verschillen.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

De dieren worden bij aankomst gehuisvest op strooisel. Gedurende 12 dagen vanaf de eerste inoculatie worden de dieren op roostervloeren gehuisvest om herinfectie en een ongecontroleerd verloop van de infectie te voorkomen. Huisvesting op roostervloeren gaat ten koste van de mogelijkheid tot stofbaden, maar gemakkelijke toegang tot voer en water en ruimte om te lopen blijft bestaan.

Na deze periode worden de dieren weer op schoon strooisel gehuisvest tot aan het einde van de proef.

De bezettingsgraad voldoet aan de eisen voor proefdieren tot 36 dagen leeftijd. Het gros van de proeven zal niet langer duren dan 35 dagen. Een dergelijke groeiperiode komt redelijk overeen met de praktijk in Nederland. Er zijn echter regio's, zoals Italië en Spanje, waar het gebruikelijk is om vleeskuikens gedurende een langere groeiperiode aan te houden. In een enkel geval kan het dus voorkomen dat een opdrachtgever expliciet een langere groeiperiode wil. In die gevallen kan het voorkomen dat de bezetting gedurende korte tijd (van dag 37 tot dag 42) iets hoger is dan in de eisen voor proefdieren staat vermeld, namelijk niet de vereiste 0.21 m², maar 0.17 m² (alleen indien de dieren een gewicht van 2.4 kg overschrijden). Ondanks de iets hogere bezettingsgraad hebben de dieren dan nog steeds zeer gemakkelijk toegang tot water en voer, en nog steeds de ruimte om te lopen en te stofbaden.

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.

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

X Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Door de aard van de infectie kunnen de dieren (uitgezonderd de negatieve controle) verschijnselen van NE laten zien, zoals lusteloosheid, diarree, bol zitten en een lagere voeropname. Dit valt niet te voorkomen of veterinair te behandelen, omdat dat zou interfereren met de proefbehandelingen. Bij ernstige symptomen die geen uitzicht op verbetering geven, wordt een humaan eindpunt toegepast.

In gevallen waarbij bloedmonsters genomen moeten worden (als het niet in combinatie met euthanasie wordt uitgevoerd), kunnen de dieren pijn ervaren door het aanprikken van de ader. Dit is een kortdurende handeling en de pijn is relatief gering. Het toedienen van de verdoving zou evenveel ongerief opleveren als het afnemen van bloed. Daarom is besloten geen verdoving toe te passen.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1) Euthanasie
- 2) Inoculatie
- 3) Tijdelijke huisvesting op roostervloeren

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Euthanasie wordt uitgevoerd d.m.v. vergassing. Orale inoculatie veroorzaakt een onprettig gevoel. De tijdelijke huisvesting op roostervloeren is minder comfortabel dan huisvesting op strooisel.

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

Stress door hanteren wordt tot een minimum beperkt door deze handeling door ervaren en gekwalificeerd personeel uit te laten voeren. Voor inoculatie wordt spuitje met een speciale naald met rubberen stopje gebruikt, zodat er geen beschadigingen aan de bek en/of keelholte kunnen ontstaan. Het ongerief door euthanasie wordt zoveel mogelijk voorkomen door de juiste gasconcentraties toe te passen, waardoor het dier snel buiten bewustzijn raakt. Het ongerief door roosterhuisvesting wordt zoveel mogelijk beperkt door deze periode niet langer dan 12 dagen te laten duren en door aangepaste maaswijdtes te gebruiken, afhankelijk van de leeftijd van de dieren.

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.

X Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

De verschijnselen als gevolg van NE (sleme dieren, lage voeropname, natte mest), duren meestal 2 à 3

dagen. Daarna zet het herstel in, wat onder andere af te lezen is aan een stijgende lijn in de voeropname en een afname van de darmschade. Proeven met dit model hebben in het verleden laten zien dat 6 dagen na de *Clostridium* inoculatie de darmschade geheel verdwenen is.

Dieren waarbij op de 3e dag na de *Clostridium* inoculatie geen herstel is ingezet, of die ernstige symptomen hebben (bijv. ernstige, bloederige diarree, apathisch gedrag, dier is niet aan te sporen tot beweging) waar na 1 dag (dit is 2 dagen na *C. perfringens* inoculatie) geen verbetering in zit, hebben een humaan eindpunt bereikt en worden geëuthanaseerd.

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

Vooraf de dieren in de positieve controle lopen kans deze criteria te halen. Dit is ongeveer 13% van het totaal aantal dieren.

Een tijdige herkenning van humane eindpunten wordt geborgd door bij de dagelijkse controles dieren die bovenstaande ziekteverschijnselen vertonen een kleurmerk te geven. Elke dag van de week heeft een eigen kleurcode om dieren met milde symptomen te merken. Daarnaast wordt één kleur gereserveerd om dieren met ernstiger symptomen te merken. Op deze manier kunnen dieren met milde symptomen in de tijd gevolgd worden, en dieren met ernstiger symptomen snel geïdentificeerd worden. Bij de dierruimtes zijn werkvoorschriften aanwezig die helpen beslissen wanneer een humaan eindpunt is bereikt.

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.

Het ongerief wordt geclassificeerd als matig. Het ongerief bij de negatieve controle wordt geclassificeerd als licht.

Het percentage dieren dat licht ongerief ondergaat, is gebaseerd op het aandeel dieren in de negatieve controle, die niet geïnfecteerd worden. Uitgaand van een situatie dat er 8 proefgroepen zijn (zie onderdeel B.), waarvan één groep de negatieve controle is, is dat 12.5% (afgerond 13%) van het aantal dieren.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Darmlaesies zijn een cruciale responsparameter. Om die te kunnen scoren, moet het dier geëuthanaseerd worden.

NE is geen risico voor de volksgezondheid. De overgebleven dieren zouden aan het eind van de proef in principe afgeleverd mogen worden aan het slachthuis, hoewel er een kans bestaat op afkeur door leverafwijkingen. Daarnaast gaat het hier om proefdieren die een experimentele infectie hebben doorgemaakt. Daarom is het niet gepast om de dieren in de voedselketen te laten komen, en worden de dieren aan het eind van de proef geëuthanaseerd en vernietigd.

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.

X Ja

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD246002016766**
2. Titel van het project: Het onderzoeken van de effectiviteit van farmaceutische en alternatieve middelen en voerstrategieën tegen darminfecties bij pluimvee
3. Titel van de NTS: Verbeteren van darmgezondheid in pluimvee
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
[REDACTED]
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 8-12-2016
Aanvraag compleet: ja
In vergadering besproken: 19-12-2016
Anderszins behandeld:
Termijnonderbreking(en) van 31-12-2016 tot 12-01-2017 en van 17-01-2017 tot 26-01-2017
Besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen: n.v.t.
Aanpassing aanvraag: 12-01-2017
Advies aan CCD: 27-01-2017
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: 31-12-2016
Gestelde vragen *en antwoorden*:
M.b.t. beide appendices:
De onderzoekers geven bij A (Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters) aan, dat ze een tweezijdige test uitvoert. Het is de DEC niet duidelijk, waarom dit niet eenzijdig kan, aangezien ze op zoek zijn naar een positief effect van de teststoffen en zij verzoekt dit nader toe te lichten.
Van de te onderzoeken teststoffen wordt inderdaad een positief effect verwacht bij geïnfecteerde dieren. Dat is vaak gebaseerd op antibacteriële effecten gericht tegen een micro-organisme. Dit kan een gunstig effect hebben op de ernst van eventuele darmschade. Van sommige teststoffen is echter bekend dat ze een negatief effect kunnen hebben op productieprestaties. Dit is bijvoorbeeld het geval met bepaalde fytoenen, die weliswaar een antibacterieel effect kunnen hebben, maar ook een bittere smaak. Dit kan een negatief effect hebben op de voeropname, en daardoor op de groei en/of het herstel na de infectie. Daarom wordt tweezijdig getoetst.
Bovendien vraagt de DEC zich af, of het percentage, dat de humane eindpunten bereikt (J) geen onderschatting is, aangezien dit er van uit lijkt te gaan, dat de te testen middelen inderdaad effectief zijn en zij verzoekt de onderzoekers hier op in te gaan.
De criteria van de humane eindpunten zijn geformuleerd in de wetenschap dat de geïnfecteerde dieren ziekteverschijnselen kunnen gaan vertonen, maar ook goede kans hebben om te herstellen, zelfs in de positieve controlegroep (d.w.z.

geïnficeerd, maar geen teststof ontvangen). Om een schatting te doen van het percentage dieren dat geen uitzicht heeft op herstel en zo een humaan eindpunt bereikt, ben ik juist uitgegaan van een maximum: verondersteld dat alle dieren in de positieve controle een humaan eindpunt bereiken, is dat $(1 \text{ behandeling} \times 6 \text{ herhalingen} \times 20 \text{ dieren}) / (8 \text{ behandelingen} \times 6 \text{ herhalingen} \times 20 \text{ dieren}) = 120/960 = 12.5\%$ (afgerond 13%). Zie voor de aantallen onderdeel B van de appendices. Deze schatting is eerder aan de hoge kant dan aan de lage kant. Zouden we uitgaan van een scenario van 2 humane eindpunten per kooi, dan wordt de berekening $(7 \text{ geïnficeerde behandelingen per proef} \times 6 \text{ herhalingen} \times 2 \text{ dieren}) / (8 \text{ behandelingen} \times 6 \text{ herhalingen} \times 20 \text{ dieren}) = 84/960 = 8.75\%$ (afgerond 9%). Ik verwacht dat het percentage van 13% zoals genoemd in de appendices daarom geen onderschatting is.

Daarnaast is het de DEC niet duidelijk, waarop het percentage van de dieren dat licht ongerief ondergaat is gebaseerd (13% volgens de NTS) en zij verzoekt dit bij K. (classificatie van ongerief) nader toe te lichten.

Het percentage dat licht ongerief ondergaat, is gebaseerd op het aandeel dieren in de negatieve controle, die niet geïnficeerd worden. Uitgaand van een situatie dat er 8 proefgroepen zijn, waarvan eentje dus de negatieve controle is (d.w.z. niet geïnficeerd en geen teststof ontvangen), is dat $(1 \text{ behandeling} \times 6 \text{ herhalingen} \times 20 \text{ dieren}) / (8 \text{ behandelingen} \times 6 \text{ herhalingen} \times 20 \text{ dieren}) = 120/960 = 12.5\%$ (afgerond 13%) van het aantal dieren. Bij proeven met minder proefgroepen of met een factoriële opzet (waarbij de teststof ook wordt toegepast bij dieren die niet geïnficeerd worden), wordt het aandeel dieren met licht ongerief groter en met matig ongerief kleiner.

M.b.t. Appendix 2:

De onderzoekers geven bij F. aan dat de bezettingsgraad voldoet aan de eisen voor proefdieren tot 36 dagen leeftijd en dat het gros van de proeven niet langer duren dan 37 dagen. Het is de DEC niet duidelijk, waarom het in die gevallen nodig is om voor één dag af te wijken van de proefdiernorm en verzoekt hen dit te beargumenteren.

Dit betreft een ongelukkige typefout. Het gros van de proeven duurt niet langer dan 35 dagen. Een groeiperiode van 35 dagen komt redelijk overeen met de praktijk in Nederland. Er zijn echter regio's, zoals Italië en Spanje, waar het gebruikelijk is om vleeskuikens gedurende een langere groeiperiode aan te houden. In een enkel geval kan het dus voorkomen dat een opdrachtgever expliciet een langere groeiperiode wil.

In die gevallen is de minimale oppervlakte per dier niet de vereiste 0.21 m^2 , maar 0.17 m^2 .

M.b.t. de NTS:

De DEC verzoekt u bij 3.5. de bloedafname en het nemen van weefselmonsters te verwijderen, aangezien dit post mortem zal plaatsvinden.

Onderdeel 3.5: Het nemen van weefselmonsters is verwijderd uit de NTS. Het nemen van bloedmonsters niet, omdat er soms aanvullende monsternamen nodig is, zoals beschreven bij onderdeel A: beschrijving van de behandeling. Ik denk dat het daarom juister is om bloedafname in de NTS te laten staan.

Tot slot verzoekt de DEC de NTS zo nodig aan te passen conform aanpassingen in de appendices.

Dit is aangepast

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. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. Het betreft een nieuwe aanvraag.

3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering: n.v.t.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Er wordt een methode gehanteerd met telkens dezelfde aanpak voor het onderzoeken van hetzelfde doel. De experimenten die worden uitgevoerd hangen onderling niet samen. Het gaat om verschillende middelen, waarvan de verwachting is, dat ze een onderdrukkende werking hebben op de betreffende ziekte(n), die wel een verschillend aangrijpingspunt kunnen hebben. Het feit dat er ook farmaceutische middelen worden onderzocht (met mogelijk een ander type werking, een potentere impact) heeft geen invloed op de beoordeling van de samenhang in dit project. Het is voor de DEC niet mogelijk de waarschijnlijkheid te beoordelen, dat de toegediende middelen effectief zijn. De stoffen zijn al wel in vitro getest. Dit project past binnen de CRO-regeling die er met de CCD is afgesproken.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van de aanvraag is het onderzoeken van de effecten van voederadditieven op twee infectieuze darmmodellen.
Het uiteindelijke doel van de aanvraag is het onderdrukken van infectieziekten in de vleeskuikenhouderij en daardoor verbeteren van de groei (voederconversie) en het welzijn van vleeskuikens.
De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belanghebbenden en hun morele waarden in het project zijn:
 - Proefdieren: aantasting van welzijn door darmbeschadigingen, het toedienen van ziekteverwekkers via de bek, bloedafname en het wegen van de dieren;
 - Doeldieren: verbeterde darmgezondheid en daarmee een bijdrage aan de algehele gezondheid van het dier;
 - Veehouder: economisch belang, vermindering van de afwijzing van deze vorm van bio-industrie ("licence to produce");
 - Veevoerfabrikant: economisch belang;
 - Onderzoeker/CRO: economisch belang;
 - Consumenten/ burgers: minder antibioticumgebruik.
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn. Het onderzoeksinstituut is een onafhankelijk privaat kennis- en informatiecentrum voor diervoeding en heeft de beschikking over eigen onderzoeksfaciliteiten en expertise om de geformuleerde onderzoeksvragen te beantwoorden, evenals specifieke en gestandaardiseerde modellen om milde infecties na te bootsen. Het instituut heeft zeer veel ervaring met het uitvoeren van dit type studies en relevante expertises (kennis van dierfysiologie, darmgezondheid, microbiologie, grondstoffen, voeradditieven, ervaring met het uitvoeren van infectieproeven en de daarbij behorende eisen aan monsternamen). Daarnaast heeft het dierfaciliteiten

en specifieke en gestandaardiseerde modellen die geschikt zijn voor het uitvoeren van de onderzoeksvragen in dit project, het heeft een vaste groep gekwalificeerde en ervaren onderzoekers, diervverzorgers en andere betrokkenen in dienst. Bovendien werken meerdere onderzoekers aan deze projecten, waardoor de voortgang van het project is gewaarborgd.

8. De DEC heeft vastgesteld dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de beschreven opzet en de ervaring heeft geleerd dat het haalbaar is.

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: Er wordt geen verdoving/pijnbestrijding toegepast. De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
10. De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Gedurende 12 dagen vanaf de eerste inoculatie worden de dieren op roostervloeren gehuisvest om herinfectie en een ongecontroleerd verloop van de infectie te voorkomen. Gemakkelijke toegang tot voer en water en ruimte om te lopen blijft bestaan. Na deze periode worden de dieren weer op schoon strooisel gehuisvest tot aan het einde van de proef. De bezettingsgraad voldoet aan de eisen voor proefdieren tot 36 dagen leeftijd. De meeste proeven duren niet langer dan 35 dagen. In een enkel geval is de bezetting gedurende korte tijd (van dag 37 tot 42) iets hoger dan in de eisen voor proefdieren staat vermeld. Ook dan hebben de dieren nog steeds zeer gemakkelijk toegang tot water en voer en de ruimte om te lopen en te stofbaden. De DEC acht deze argumentatie afdoende.
11. De DEC stelt vast dat het ongerief als "licht" en in sommige gevallen als "matig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Door de aard van de infectie kunnen de dieren (uitgezonderd de negatieve controle) last hebben van sloomheid, natte mest en een lagere voeropname. Daarnaast kan er sprake zijn van stress door het hanteren. De orale inoculatie, de roosterhuisvesting, de bloedmonstername, darmbeschadigingen, het toedienen van ziekteverwekkers via de bek, bloedafname en het herhaaldelijk wegen van de dieren kunnen ongerief met zich meebrengen.
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen.
13. De DEC heeft vastgesteld dat de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en dat goed is ingeschat welk percentage van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken. Per infectietype is dit verschillend omschreven. Dieren die langer of in ernstiger mate dan verwacht symptomen hebben van de infectie worden onmiddellijk geëuthanaseerd.
Vooral de dieren in de positieve controle lopen kans deze criteria te halen. Dit is ongeveer 13% van het totaal aantal dieren.

3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Voer- en drinkwateradditieven kunnen in een voortraject met laboratoriumtechnieken onderzocht worden, maar voor de uiteindelijke toepassing in de praktijk is het nodig om de effecten van bijvoorbeeld dosering en voertechnologie in het doeldier te onderzoeken, zoals de effecten op groei en voeropname. Het effect van speciale herstelvoeders op darmgezondheid kan niet in een laboratorium onderzocht worden. Ook het feit dat vleeskuikens speciale eisen stellen aan het voer, maakt dat het nodig is om dit project in het doeldier uit te voeren.

15. De DEC heeft vastgesteld dat dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Met behulp van een poweranalyse op een relevante parameter wordt bepaald welk aantal herhalingen nodig is voor beantwoording van de onderzoeksvraag. Waar mogelijk wordt hetzelfde dier gebruikt voor darmlaesiescores en monsternamen van bloed en/of weefsels, en waar mogelijk wordt hetzelfde monster gebruikt voor meerdere analyses.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De DEC zien geen extra mogelijkheden voor verfijning, anders dan die de onderzoeker nu toepast. Er wordt een milde stam gebruikt, bloedafname wordt (waar mogelijk) uitgevoerd na euthanasie.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

17. De dieren worden niet van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvrager heeft onderbouwd waarom dit noodzakelijk is. Dit type infectieproeven wordt meestal uitgevoerd met hanen, vanwege hun snellere groei en hogere efficiëntie in vergelijking met hennen.
18. Een deel van de dieren wordt gedood in het kader van het project, aangezien er darmlaesies moeten worden onderzocht. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag van het project is: Weegt het onderzoeken van de effecten van voederadditieven op twee infectieuze darmmodellen met als uiteindelijke doel het onderdrukken van infectieziekten in de vleeskuikenhouderij en daardoor verbeteren van de groei (voederconversie) en het welzijn van vleeskuikens op tegen het gebruik van de proefdieren, dat gepaard gaat met licht tot matig ongerief?
2. Bij de beoordeling van het doel heeft de DEC in overweging genomen dat darmgezondheid een essentieel onderdeel is van de algehele gezondheid van pluimvee. Als het project zijn uiteindelijke doel bereikt, zal dit voor de dieren in de houderij van substantieel belang zijn. De waarden van welzijn en gezondheid spelen in dat geval. De ziekten worden niet uitgebannen. Het project beoogt echter om via verbeterde darmgezondheid bij te dragen aan een verbeterde weerstand. Hierdoor is ook sprake van een reëel belang voor de pluimveehouders. Het gaat hierbij voornamelijk om een economische waarde. Dit geldt eveneens voor de veevoederindustrie en de onderzoekers/ CRO. Ook de maatschappij en de consumenten zullen in dat geval een gering voordeel hebben, met name in verband met het verminderen van de negatieve effecten van de intensieve dierhouderij, aangezien een verbeterde diergezondheid ook in hun belang is, bv. in het kader van antibioticaresistentie.
Tot slot zijn er waarden voor de proefdieren in het geding. Er is sprake van maximaal matige welzijnsaantasting door darmbeschadigingen, het oraal toedienen van ziekteverwekkers, bloedafname en het wegen van de dieren. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen.
3. De DEC heeft in haar afweging betrokken dat er sprake is van een project dat een samenhangend geheel betreft. Gezien de opzet is de DEC van mening dat het directe en uiteindelijke doel haalbaar zijn en dat dit onderzoek kan bijdragen aan de belangen en waarden zoals hierboven genoemd. De DEC is van mening dat het doel en de daarmee verbonden waarden het geringe/ matige ongerief voor de proefdieren rechtvaardigen en dat er in dit stadium geen mogelijkheden zijn op het terrein van vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.

De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

E. Advies

1. Advies aan de CCD:

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

Afstemming

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Onderstaande dilemma is naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies:

De DEC heeft de aanvraag besproken binnen de context: Het probleem wordt voor een deel veroorzaakt door het feit dat kippen intensief worden gehouden. Het project richt zich op het compenseren van de negatieve effecten daarvan. De noodzaak daartoe zou minder zijn bij een lagere bezetting en bij langzaam groeiende dieren. De DEC is zich terdege bewust van de gevolgen die de huidige intensieve veehouderij met zich meebrengt en zij neemt dat mee in haar ethische afweging. De DEC is van mening dat het welzijn van de dieren in de intensieve veehouderij onder druk staat en dat onderzoek een bijdrage moet leveren aan het verbeteren van de leefomstandigheden van de dieren. In de aanpak van dit project ziet de DEC mogelijkheden dat hier een bijdrage aangeleverd wordt. De DEC ziet geen directe verantwoordelijkheid voor zichzelf om te sturen op de keuze voor de strategie voor het verbeteren van diergezondheid en dierenwelzijn aangezien die al plaatsvindt voor de indiening van het project. Zij kan in dit kader enkel signaleren. Vanuit dit perspectief heeft de DEC dit project beoordeeld: gegeven de huidige omstandigheden is de DEC van mening dat het project een bijdrage kan leveren aan het verbeteren van het welzijn (inclusief gezondheid) van de dieren. In de ogen van de DEC zijn de dierproeven niet gericht op een praktijk waarbij het welzijn van de dieren zodanig beïnvloed wordt dat dit intrinsiek tot schade aan de dieren leidt. De DEC ziet dit soort projecten juist als een stap naar mogelijke verbetering binnen de huidige veehouderij. De discussie over de wenselijkheid van die veehouderijomstandigheden zal in een ander gremium dan de DEC gevoerd moeten worden.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Schothorst Feed Research BV

Postbus 533

8200 AM LELYSTAD



**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
AVD246002016766

Bijlagen

2

Datum 8 december 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 7 december 2016. Het gaat om uw project "Het onderzoeken van de effectiviteit van farmaceutische en alternatieve middelen en voerstrategieën tegen darminfecties bij pluimvee". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD246002016766. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

8 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD246002016766

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
8 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD246002016766

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 24600
Naam instelling of organisatie: Schothorst Feed Research BV
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 39084732
Straat en huisnummer: Meerkoetenweg 26
Postbus: 533
Postcode en plaats: 8200 AM LELYSTAD
IBAN: NL24RABO0337738394
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Schothorst Feed Research B.V.

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
8 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD246002016766

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Onderzoeker [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: Het onderzoeken van de effectiviteit van farmaceutische en alternatieve middelen en voerstrategieën tegen darminfecties bij pluimvee
Titel niet-technische samenvatting: Verbeteren van darmgezondheid in pluimvee
Naam DEC: DEC Wageningen UR
Postadres DEC: Droevendaalsesteeg 4 6708 PB Wageningen
E-mailadres DEC: dec@wur.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.187,-
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: Lelystad

Datum: 6 december 2016

Datum:

8 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD246002016766



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Schothorst Feed Research BV

Postbus 533

8200 AM LELYSTAD



**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
AVD246002016766

Bijlagen

2

Datum 8 december 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 8 december 2016

Vervaldatum: 7 januari 2017

Factuurnummer: 16700766

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD246002016766	€ 1.187,00

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.



10.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Schothorst Feed Research BV

Postbus 533

8200 AM LELYSTAD



**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
AVD246002016766

Datum 20 februari 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 7 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het onderzoeken van de effectiviteit van farmaceutische en alternatieve middelen en voerstrategieën tegen darminfecties bij pluimvee" met aanvraagnummer AVD246002016766. 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

De dieren in de positieve controle lopen kans een humaan eindpunt te bereiken. Hoe borgt u dat humane eindpunten tijdig worden herkend en ernstig ongerief wordt voorkomen?
Zonder deze aanvullende informatie kan de beslissing nadelig voor u uitvallen omdat de gegevens onvolledig of onduidelijk zijn.

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Datum:

20 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD246002016766

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Schothorst Feed Research BV

████████████████████

Postbus 533

8200 AM LELYSTAD



**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

AVD246002016766

Bijlagen

1

Datum 1 maart 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████

Op 7 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het onderzoeken van de effectiviteit van farmaceutische en alternatieve middelen en voerstrategieën tegen darminfecties bij pluimvee" met aanvraagnummer AVD246002016766. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 22 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. In Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 is beschreven hoe de humane eindpunten tijdig worden herkend.

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 "Het onderzoeken van de effectiviteit van farmaceutische en alternatieve middelen en voerstrategieën tegen darminfecties bij pluimvee" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 maart 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 Wageningen UR gevoegd. Dit advies is opgesteld op 27 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:
1 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD246002016766

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:


M. G. de Pater
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: Schothorst Feed Research BV
Adres: Postbus 533
Postcode en plaats: 8200 AM LELYSTAD
Deelnemersnummer: 24600

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 maart 2017 tot en met 1 januari 2022, voor het project "Het onderzoeken van de effectiviteit van farmaceutische en alternatieve middelen en voerstrategieën tegen darminfecties bij pluimvee" met aanvraagnummer AVD246002016766, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 7 december 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 27 januari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 27 januari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 27 januari 2017, ontvangen op 27 januari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 22 februari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Infectiemodel coccidiose				
	Kippen / vleeskuikens	15.840	88% Matig 12% Licht	
3.4.4.2 infectiemodel necrotische enteritis				
	Kippen / vleeskuikens	19.200	88% Matig 12% Licht	

Aanvraagnummer:

AVD246002016766

Voorwaarden

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

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

Gedurende de looptijd van de vergunning, koppelt de aanvrager aan de CCD terug welk soort testproduct, welke type dierproef, de wijze van uitvoering en bijbehorend ongerief is uitgevoerd onder deze vergunning. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 31 januari door de CCD ontvangen zijn en rapporteert over het afgelopen kalenderjaar (1 januari - 31 december). Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken. Wanneer u overtuigend en onbetwistbaar kan aantonen dat er geen gegevens over de geteste stof kunnen worden vrijgegeven omdat de opdrachtgever deze als vertrouwelijke informatie heeft geclassificeerd kunt u deze informatie buiten de rapportage houden.

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



Aanvraagnummer:

AVD246002016766

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 verdooving

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

Aanvraagnummer:
AVD246002016766

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Inventaris Wob-verzoek W17-08										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	Documenten NTS2016779	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	Projectvoorstel oud			x						
3	Niet-technische samenvatting	x								
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x						
5	DEC-advies				x		x	x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
7	Verzoek nieuw projectvoorstel				x		x	x		
8	Projectvoorstel nieuw			x						
9	Advies CCD		x						x	
10	Beschikking en vergunning				x		x	x		

AVD 247 00 2016 279



07 DEC. 2016

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 24700 <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 Brains On-Line B.V. Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [REDACTED] KvK-nummer 2094714
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 De Mudden 16 Postbus Postcode en plaats 9747 AW Groningen IBAN NL59INGB0681766174 Tenaamstelling van het rekeningnummer Brains On-Line B.V.
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 type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" 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 Dhr. Mw.
- Functie
- Afdeling
- Telefoonnummer
- E-mailadres
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 2 - 2017
- Einddatum 31 - 1 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Perifere farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Toepassing van perifere microdialyse voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC Rijksuniversiteit Groningen
- Postadres Antonius Deusinglaan 1 9713 AV Groningen
- E-mailadres secrdec@umcg.nl

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935 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:

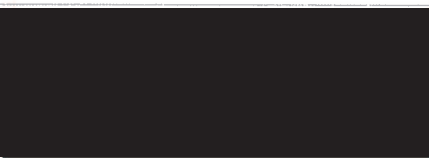
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan 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 Groningen

Datum 5 - 12 - 2016

Handtekening 





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.

Onze instelling verzorgt contractonderzoek om farmaceutische bedrijven en academische instellingen een passend inzicht te geven in de mogelijkheden van potentiële nieuwe geneesmiddelen. Met behulp van verschillende onderzoeksplatforms kunnen wij werkingsmechanisme, effectiviteit en biodistributie van nieuwe stoffen testen. Eerder hebben wij projecten aangevraagd voor meting van elektrische signalen in het centraal zenuwstelsel en perifere systemen en voor toepassing van de microdialyse techniek in het centraal zenuwstelsel. De huidige aanvraag is gericht op toepassing van de microdialyse techniek op perifere weefsels/organen.

In 2004 en 2007 heeft de FDA (Food and Drug Administration) rapporten uitgegeven waarin werd geanalyseerd wat de belangrijkste uitdagingen en oplossingen zijn bij de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen, met als doel het aantal succesvolle marktintroducties van nieuwe geneesmiddelen te verhogen. Het eerste rapport "Innovation and Stagnation: Challenge and Opportunities on the Critical Path to New Medical Products" identificeert het gebrek aan kennis over veiligheid en effectiviteit van nieuwe stoffen als een belangrijke uitdaging. In het tweede rapport "Critical Path Opportunities for Generic Drugs" wordt toepassing van perifere microdialyse in klinische studies benoemd als een specifieke tool voor het oplossen van deze uitdagingen. De techniek maakt het mogelijk de lokale vrije actieve concentratie en activiteit van een test-stof te bepalen. Een belangrijk voordeel van de techniek is dat de plaatsing van de microdialyse sonde minimale weefselschade oplevert en dat meer monsters kunnen worden genomen dan bijvoorbeeld met het nemen van weefsel biopsies. De methode en onze uitvoering ervan staat ook op dit moment nog volop in de belangstelling van de FDA. Zij hebben de wetenschappelijke directeur van ons bedrijf uitgenodigd om begin 2017 een lezing te komen geven over toepassingen en translationele waarde van microdialyse in preklinisch onderzoek.

Voordat een stof klinisch getest kan worden is het van belang dat de biologische beschikbaarheid bij een specifieke test dosering wordt bepaald in *in-vitro* en in *in-vivo* systemen. De *in-vitro* systemen geven een positieve indicatie van de werkzaamheid van een test stof. De *in-vivo* systemen geven informatie over de werkelijke biologische beschikbaarheid van de stof in een compleet organisme waarin ook metabolisme en excretie van de stof worden meegenomen. Tevens biedt *in-vivo* analyse een mogelijkheid om potentiële onbedoelde (off-target) negatieve effecten te identificeren.

Aanleiding voor dit project zijn onze uitgebreide ervaring met toepassing van de microdialyse techniek in onderzoek naar ziekten van het centraal zenuw stelsel en de vraag vanuit onze klanten naar toepassing van deze techniek in perifere weefsels. In het verleden hebben wij methoden ontwikkeld voor microdialyse in vrijbewegende dieren in:

- de ileum,
- het cardiovasculair systeem,
- de medullae spinalis,
- longepitheel weefsel,
- de subcutis,
- het beenmerg van de tibia.

In de literatuur zijn ook methoden beschreven voor bemonstering van spier- en vetweefsel, lever, nieren, pancreas en tumor xeno-tranplantaten.

In het kort omvat het voorgestelde project de volgende onderdelen:

1. Gebruik van wild-type en/of (transgene-) ziektemodel dieren (ratten, muizen)
2. Het toediening van test-stof(fen) via verschillende toedieningsroutes
3. Bepaling van de concentratie van de toegediende stof en/of ziekte-gerelateerde biomarkers in weefsels

De centrale techniek die zal worden toegepast in dit project is microdialyse. Deze techniek is gebaseerd op het gebruik van semi-permeabele membranen die met behulp van een kleine canule (~600 µm in doorsnede) in weefsel kunnen worden ingebracht. De canule wordt onder anesthesie geplaatst. Na herstel van het dier wordt de canule geperfuseerd met een fysiologisch relevante oplossing zodat er over de membraan uitwisseling van stoffen uit de extracellulaire ruimte kan plaatsvinden. Het perfusaat wordt opgevangen en gebruikt om de concentratie van de test-stof en bio-markers te bepalen. Door toepassing van specifieke membranen, samenstelling van de doorloopvloeistof en de snelheid waarmee de vloeistof langs de membraan gaat, kunnen experimenten optimaal ingericht worden, aansluitend bij de stof van interesse.

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?

Doelstelling van het huidige project is het vergaren van translationele kennis over ziekten, ziekteprocessen en vooral de biodistributie en farmacologie van potentiële nieuwe geneesmiddelen met behulp van microdialyse in perifere weefsels. Specifiek worden met behulp van microdialyse farmacokinetische (biologische beschikbaarheid) en farmacodynamische (effectiviteit) eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen bepaald. Deze informatie is essentieel om de door de FDA geïdentificeerde uitdagingen in de ontwikkeling van geneesmiddelen aan te pakken, zodat het aantal succesvolle marktintroducties kan worden verhoogd.

Haalbaarheid van deze doelstelling is hoog, aangezien er gewerkt zal worden met gevalideerde en gestandaardiseerde protocollen.

3.3 Belang

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

De informatie verkregen in dit project levert een wetenschappelijke bijdrage door:

- het ophelderen van processen onderliggend aan ziektes
- identificatie en kwantificering van bio-markers voor diagnostische doeleinden

Vanuit maatschappelijk oogpunt is het project van belang voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen, waarbij op een snelle kostenefficiënte manier antwoord wordt gegeven op door de FDA geïdentificeerde uitdagingen in het (pre-)klinisch onderzoek naar nieuwe geneesmiddelen. Het project levert een bijdrage door in een vroeg stadium in de ontwikkeling niet werkzame stoffen, stoffen met bijwerkingen/off-target effecten en stoffen die niet bij hun beoogde doel komen (door biologische barrières of metabolisering/uitscheiding) te identificeren en uit te sluiten, waardoor geen onnodige tijd en gelden worden besteed aan verdere ontwikkeling. Daarnaast levert het onderzoek zinvolle translationele informatie die van belang is bij het efficiënt uitvoeren van verder klinisch onderzoek.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Voor alle te testen stoffen wordt op basis van een heldere vraagstelling gedefinieerd hoe het individuele experiment wordt ingericht. De volgende kernvragen zijn hiervoor van belang:

- Welke diersoort is het meest geschikt voor het onderzoek: rat, muis of cavia?
- Eventueel toepassen van een ziekte specifiek (transgeen-) diermodel?
- Welke test-stof wordt via welke toedieningsroute gegeven?
- Welk beoogd doel-orgaan moet worden gemonitord, eventueel, in welk orgaan zou de test-stof afwezig moeten blijven?
- Bepaling van biologische beschikbaarheid en/of ook de effectiviteit van de test stof?

Op basis van antwoorden op bovengenoemde vragen wordt het betreffende proefdier volgens een passende SOP onder anesthesie gecanuleerd. Nadat het dier is bijgekomen en hersteld van de plaatsing van de canule wordt de canule aangesloten en geperfuseerd met een fysiologisch relevante oplossing. Na het verzamelen van een aantal basale monsters kan de test-stof worden toegediend. In de monsters die worden verzameld na toediening kan de concentratie van endogene- en exogene stoffen worden bepaald.

Ter vergelijking en aanvulling van de data zullen soms ook weefsel monsters genomen (moeten) worden op specifieke tijdstippen. Microdialyse levert namelijk alleen informatie op over vrije extracellulaire stofconcentraties en niet van totale concentraties (dit is inclusief de intracellulaire en eiwit gebonden

concentratie). De verhouding van vrije- en totale concentratie is een belangrijke parameter voor de biologische beschikbaarheid van test-stoffen. Het verzamelen van dergelijke monsters kan tot een minimum worden beperkt door tijdstippen voor monstername te kiezen, zoveel mogelijk organen gelijktijdig uitnemen en door organen uit te nemen aan het einde van het bijpassende microdialyse experiment.

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

Microdialyse in perifere weefsels:

Voor het uitvoeren van deze proeven wordt het dier onder passende anesthesie en analgesie gecanuleerd in de betreffende organen. De canule wordt onderhuids getunneld zodat de in- en uitgang zich bevindt op een lokatie waar het dier de canule niet zelf kan verwijderen of beschadigen. Nadat het dier voldoende is hersteld worden de canules aangesloten met dunne slangetjes op een pomp die met een constante stroom van 0.1 tot enkele microliters per minuut de canule perfuseren. De perfusievloeistof is een fysiologisch relevante vloeistof, om effecten van de samenstelling van de vloeistof op het omringende weefsel te voorkomen.

Het perfusaat wordt opgevangen aan het uiteinde van de canule en kan worden geanalyseerd voor concentratie van de test-stof en/of een of meerdere bio-markers. Het opgevangen monstervolume is afhankelijk van de analytische bepaling(en) die moeten worden gedaan. Voor alle experimenten geldt dat eerst een aantal basale monsters moeten worden verzameld, waarna het dier een test-stof of *vehiculum* krijgt toegediend. Monsters kunnen opgevangen worden tot uren en zelfs dagen na toediening. Het dier heeft de mogelijkheid om tijdens het experiment vrij te bewegen en gedrag te vertonen.

Door microdialyse te combineren met het bemonsteren van bloed(producten) en/of CSF en/of post-mortem weefselafname is het mogelijk een voorspelling te doen van kinetiek van een test stof in de diverse bio-compartimenten (organen/weefsels). Dit is een zeer krachtige methode om werkingsmechanisme, effectiviteit, concentratie en bijwerkingen van potentiële nieuwe geneesmiddelen te bestuderen.

Verzamelen van weefsel monsters:

Deze methode is een alternatief of aanvulling voor microdialyse techniek en levert ook informatie over de verdeling van een test-stof en het effect van deze test-stof op bio-markers. Dieren krijgen de test stof toegediend en op specifieke tijdstippen getermineerd. Organen van de dieren worden uitgenomen en gehomogeniseerd. Het homogenaat wordt gecentrifugeerd en het supernatant wordt gebruikt voor de analyse van concentraties van de test stof of bio-markers. Deze methode heeft een aantal belangrijke nadelen:

- Er zijn meer dieren nodig $n = 4-6$ per tijdstip
- De methode maakt geen onderscheid tussen gebonden en ongebonden (of tussen intra- en extracellulaire) concentraties
- Aanwezigheid van bloed in het orgaanweefsel kan de gemeten concentratie beïnvloeden

Voor bepaalde vraagstellingen kan het echter van groot belang zijn om toch een totale concentratie in weefsel te bepalen. Bijvoorbeeld wanneer deze informatie gebruikt kan worden om vergelijkingen met eerdere experimenten te maken, of wanneer het niet mogelijk is om in microdialyse monsters de concentratie van de bio-marker te bepalen (bijvoorbeeld van eiwit aggregaten). In een dergelijk geval is een goede afweging van de tijdstippen, toedieningen en dieraantallen van groot belang.

Concentraties van test-stof en/of bio-markers worden in alle verzamelde monsters uiteindelijk uitgevoerd met HPLC-MS/MS of ELISA bepalingen. Beide technieken zijn zeer gevoelig en maken het mogelijk om met relatief kleine monster volumes een uitspraak te doen over concentraties. Met de HPLC-MS/MS methodes is het vaak mogelijk om veel informatie uit één sample te verkrijgen, doordat verschillende stoffen uit hetzelfde monster geanalyseerd kunnen worden. Dit draagt bij aan een vermindering van het benodigde aantal proefdieren.

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.

Fasering:

- De potentiële nieuwe geneesmiddelen worden getest in een *in-vitro* setting op een passende interactie met de betrokken receptor (target engagement) en potentiële werkzaamheid (door cliënt)
- De stof is getest op toxicologische eigenschappen, waarbij vaak ook een eerste inschatting kan

worden gemaakt van de effectieve dosering in farmacodynamische en farmacokinetische experimenten (door cliënt)

- Op basis van bovengenoemde informatie en de vragen geformuleerd onder 3.4.1 wordt een experimenteel protocol opgezet voor de verdere bestudering van de test-stof
- In het geval van een farmacokinetische studie wordt eerst in een *in-vitro* studie gecontroleerd of het met de beoogde opzet inderdaad mogelijk is om een meetbare concentratie van de test-stof in het perfusaat op te vangen
- Het protocol wordt, na goedkeuring door de IvD (toetsing op: haalbaarheid, passend binnen de vergunning, 3V overwegingen en dierenwelzijn), uitgevoerd
- Met de gegevens gewonnen uit de verzamelde monsters kan de cliënt het vervolg traject voor de test-stof bepalen. De IvD voert een post-hoc evaluatie van de experimenten uit

De samenhang van de verschillende proeven die worden uitgevoerd onder dit project bestaat (net als bij onze andere vergunningen) uit de toepassing van de centrale techniek voor de verzameling van de monsters: de microdialyse.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Perifere farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen.
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|---|
| 1 | Perifere farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen. |
- 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.

Op basis van de jaarcijfers van de FDA voor 2015 zoals gereviewed in 2015 FDA drug approvals (Nat Rev Drug Discov. 2016; 15:73-76) is het aantal nieuwe markttoelatingen voor geneesmiddelen gestegen sinds het begin van deze eeuw. Een groot aantal van deze stoffen zijn echter niet "first in class" en daarmee blijft de noodzaak voor een goed ontwikkelings proces hoog, de FDA heeft hierbij microdialyse als een van de essentiële tools beschreven.

Brains On-Line ondersteunt de ontwikkeling van nieuwe farmaca voor de kliniek door het aanbieden van verschillende onderzoeksplatforms voor nieuwe verbindingen. De technieken kunnen ook worden gebruikt om onderliggende mechanismen van de ziekten op te helderen; deze kennis kan weer worden toegepast bij de verdere ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen.

Perifere microdialyse is een zeer geschikte methode om met relatief weinig dieren een farmacokinetisch profiel te genereren - in vergelijking tot methoden waarbij groepen dieren moeten worden getermineerd op specifieke tijdstippen om weefsels uit te nemen. Daarnaast kunnen wij door toepassing van zeer gevoelige analyse methoden in parallel uit dezelfde monsters ook een farmacodynamische respons bepalen.

Met behulp van de in deze experimenten bepaalde parameters is het mogelijk om de partitionering van potentiële nieuwe geneesmiddelen in verschillende compartimenten te bepalen. Hiermee kan worden vastgesteld of de stof in voldoende concentratie aankomt in het doel-orgaan om effectief te zijn. Daarnaast kan worden bepaald dat de stof in andere compartimenten niet onnodig ophoopt. De effectiviteit kan ook nog direct worden bepaald door het bepalen van concentratie veranderingen van specifieke bio-markers.

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) Voor het uitvoeren van een microdialyse experiment worden één, twee of drie microdialyse canules chirurgisch in het dier geplaatst. Het plaatsen van de canules vindt altijd onder diepe (inhalatie) anesthesie plaats, in combinatie met een langwerkend systemisch analgeticum en topicale analgesie. Alle operaties worden uitgevoerd onder schone/aseptische condities. De microchirurgen werken volgens protocollen waarmee het risico op uitval door infecties wordt geminimaliseerd. Deze protocollen beschrijven zowel de voorbereidingen van het dier (zoals scheren en desinfecteren van de huid in het operatiegebied), de handelingen met chirurgische materialen (wat is op welke wijze gedesinfecteerd of gesteriliseerd) als de werkwijze tijdens de operatie (handschoenen/mondmasker/niet onnodig boven operatieveld komen/schone en vuile zijde).
Afhankelijk van het doelgebied worden verschillende procedures gebruikt, deze worden hieronder besproken. Alle procedures kunnen in zowel rat als muis worden uitgevoerd tenzij anders vermeld.
 - a) het ileum; de huid over de buik wordt opgetild en een incisie wordt gemaakt van net boven de genitaliën tot net onder het middenrif. Nadat de buikwand lokaal verdoofd is wordt ook deze geopend over de linea alba. Na identificatie wordt een 3 cm deel van het ileum geplaatst op saline bevochtigd steriel gaas dat over de wond ligt. Het ileum wordt afgedekt met vochtig gaas en 2 minuten gekoeld om de peristaltiek te remmen. Met een naald (27G) wordt een 8 mm lange holte gecreëerd tussen de sub-mucosale spierlaag en de overlangse spierlaag, waarbij de punt van de naald wegwijst van het ceacum. De transversale probe (ofwel longitudinale probe: dit type probe is eigenlijk één doorlopende tubing onderbroken door een hol membraan waar de dialyse plaatsvindt) wordt vanaf de punt van de naald ingebracht. De naald wordt langzaam teruggetrokken waarbij de probe langzaam door de vooraf gecreëerde holte wordt getrokken. De uiteinden van de transversale probe worden bij elkaar gebracht en met een biocompatibele slang samengebundeld. De slang met de probe uiteinden wordt verder subcutaan getunneld naar de kop van het dier, waarbij erop wordt gelet dat er voldoende ruimte is voor het dier om normaal te kunnen bewegen. Bevestiging van de probe op de schedel is gelijk voor alle procedures en wordt hieronder beschreven. Het ileum wordt gecontroleerd op kleur en peristaltische activiteit en de afwezigheid van bloeditstortingen. De probe wordt met een enkele hechting aan de buikwand vastgezet, waarna de buikwand met één doorlopende hechting wordt gesloten. De huidlaag wordt gesloten dmv individuele hechtingen.
 - b) het cardiovasculaire systeem; de methode is gepubliceerd onder: "Development of a Rat Plasma and Brain Extracellular Fluid Pharmacokinetic Model for Bupropion and Hydroxybupropion Based on Microdialysis Sampling, and Application to Predict Human Brain Concentrations (Cremers *et al.* Drug Metab Dispos. 2016;44: 624-633)". In het kort: na lokalisatie van de vena jugularis wordt in de overliggende huid een incisie gemaakt van ongeveer 1 cm. Nadat lokale verdoving is ingewerkt wordt het weefsel gespreid met een schaar tot de vena jugularis zichtbaar is. Deze wordt vrijgeprepareerd en op een steriele insert geplaatst. De vene wordt rostraal en caudaal afgebonden, waarna met een microchirurgische schaar een incisie door de vaatwand wordt gemaakt. Door deze incisie wordt de microdialyse probe ingebracht. Controle op juiste plaatsing vindt plaats door het op en neer bewegen van de voorpoot. Dit moet mogelijk zijn zonder dat de probe beweegt anders kan de canule in de vena subclavia terecht zijn gekomen. Op de probe zit een lijmbolletje dat de opening in de vaatwand afdicht en dat met twee enkelvoudige hechtingen om de vene wordt vastgezet, zodat de probe ook niet meer kan bewegen ten opzichte van het vat. Hierna wordt de rest van de probe verder subcutaan getunneld wordt naar de kop van het dier. Nadat is gecontroleerd dat de vene met de probe niet lekken wordt de huid in de nek van het dier met hechtingen gesloten.
 - c) de medullae spinalis; deze ingreep is alleen mogelijk bij ratten, er wordt een incisie gemaakt in de huid vanaf 0.5 cm caudal van de ogen tot 1 cm rostral van de scapula. Nadat passende analgesie op de spieren en het periost is toegepast wordt een 5 mm diepe incisie gemaakt in de nek-spieren. Met behulp van een microscoop wordt de incisie verder geopend todat het occipital bot en het atlantoccipital membraan zichtbaar zijn. Met een gebogen naald (27G) wordt lateraal van de midline (i.v.m. de onderliggende arterie) in caudale richting een zeer kleine opening gemaakt. Eventueel

vrijkomende cerebrospinale vloeistof (CSF) wordt steriel weggedept. Met een vaatpincet wordt de microdialyse probe of guide 2 cm ingebracht. De probe wordt voorzichtig verder in caudale richting bewogen. Wanneer het niet mogelijk is verder te bewegen, wordt de probe voorzichtig enkele millimeters terug getrokken en de wervels voorzichtig op en neer bewogen tot de probe verder ingebracht kan worden. Tijdens het inbrengen wordt door twee personen gelet op indicaties van schade aan het ruggenmerg: veranderingen in hart-ritme, ademhaling, spasmen. Wanneer er schade optreedt is het permanent, het dier zal waarschijnlijk deels verlamd zijn en dient te worden getermineerd. Wanneer de tip van de probe op de juiste plaats in de lumbale regio ligt wordt zeker gesteld dat er geen CSF meer langs de opening in het membraan lekt. In de meeste gevallen zal het occipitaal membraan zich sluiten om de schacht van de microdialyse probe. Wanneer dit niet het geval is, is verdere lekkage van CSF na beëindiging van de operatie niet uit te sluiten en is het niet verantwoord het dier verder te laten leven (humaan eindpunt zie ook onder paragraaf 2J van deze aanvraag). Het uiteinde van de probe wordt op de schedel bevestigd (zie hieronder). De spierlaag wordt gesloten met één doorlopende hechting. De hoofdhuid en de huid in de nek worden gesloten door middel van individuele hechtingen.

- d) longepitheel weefsel; deze ingreep is alleen mogelijk bij ratten en niet te combineren met het plaatsen van microdialyse probes in andere organen. Er wordt een incisie van 15 millimeter in de huid net boven het sleutelbeen in de richting het hoofd door de huid als spieren. Nadat passende lokale analgesie is toegedient, wordt de trachea vrijgeprepareerd. Met de punt van een naald wordt net posterior van de parathyroid tussen de kraakbeenschrijven een kleine incisie gemaakt met een naald (21G). De long-probe wordt op de dag van experiment geplaatst in de tijdens de operatie geplaatste long-guide. Deze guide is gemaakt van speciaal materiaal dat de flexibiliteit heeft om met het dier mee te bewegen, maar door toepassing van een rigide insert gericht kan worden ingebracht. De steriele long-guide wordt voorzichtig door de incisie ingebracht, wanneer er geen vocht meer door de opening naar buiten komt (tot die tijd wordt het vocht steeds steriel weggedept). Wanneer de guide 9 millimeter is ingebracht wordt deze aan de buitekant met behulp van een speciale "retainer-bead" kruislings vastgehecht aan de trachea. Het uiteinde van de probe wordt voor het oor langs op de schedel bevestigd (zie hieronder). De wond in de hals wordt gesloten met een doorlopende hechting. Voor effectieve pijnbestrijding wordt een specifiek, op het dier afgestemd, post-operatief pijnbestrijdingsregime toegepast, gebaseerd op onze ervaring met deze techniek. In verband met de aanwezigheid van (potentieel pathogene) microorganismen in de luchtwegen moeten de dieren na de operatie goed gemonitord worden, dit gebeurt op meerdere tijdstippen na operatie, inclusief monitoring in de nacht. Tevens worden de dieren gehouden in een zuurstofverrijkte omgeving.
- e) de subcutis / subdermis / subdemaal tumor xeno-transplantaat (in dieren die door een externe partij worden geleverd); meestal wordt deze procedure uitgevoerd in de huid op de rug van het dier, maar het is ook mogelijk om de probe aan de buikzijde te plaatsen en de katheter subcutaan te tunnelen zoals beschreven onder a) het ileum. Voor deze experimenten is het mogelijk 2 type probes te gebruiken:
- een transversale (of longitudinale) probe, deze wordt ingebracht zoals beschreven onder a) de ileum door met behulp van een naald door het gebied van interesse te tunnelen; deze methode is voornamelijk van toepassing wanneer farmacodynamische stoffeigenschappen worden bestudeerd en/of het weefsel van interesse aan de ventrale zijde van het dier zit
 - een klassieke (I- of Y-vormige) microdialyse probe, met een naald (27G) wordt een subdermale/subcutane holte gecreëerd, waarin de probe kan worden geplaatst. De probe wordt met een hechting op de juiste plek gehouden; deze methode is voornamelijk van toepassing wanneer farmacokinetische stoffeigenschappen worden bestudeerd en/of het weefsel van interesse aan de dorsale zijde van het dier zit
- De uiteinden van de probe worden naar de schedel gebracht en daar bevestigd.
- f) het beenmerg van de tibia; deze ingreep is alleen mogelijk bij ratten, er wordt een incisie van 1 cm gemaakt aan de binnenzijde van de poot van het dier, beginnende op 5 mm distaal vanaf het

kniegewricht. Nadat passende analgesie op de onderliggende spieren is toegepast worden deze in de lengterichting gesneden tot de tibia zichtbaar is. Nadat het periost op passende wijze is behandeld met een lokaal werkend analgeticum, en er voldoende ruimte is gecreëerd wordt er op ongeveer 7 mm vanaf het kniegewricht een gaatje in het botweefsel geboord, onder een hoek van 60 graden. Deze opening moet vrij zijn van obstakels of botsplinters (te testen met een naald (25G)). Wanneer de doorgang vrij is en het omringende weefsel steriel is schoongemaakt kan een speciale bot-probe worden ingebracht. Deze probe zit onder een hoek en is regide, waardoor hij goed kan worden ingebracht. De probe wordt met bio-compatibele lijm aan het bot worden vastgezet, de uiteinden van de probe worden naar de schedel gebracht en bevestigd. De spierlaag wordt gesloten met één doorlopende hechting. De huid wordt gesloten met individuele hechtingen.

- g) Lever / nier / spier en pancreas weefsel; kunnen allen met behulp van een transversale probe worden bemonsterd. Het inbrengen van een dergelijke probe is beschreven onder a) het ileum. Het benaderen van de verschillende organen wordt hieronder kort beschreven. In alle gevallen worden de probes met een enkele hechting vastgezet, de spieren waar mogelijk met één doorlopende hechting gesloten en de huid met individuele hechtingen. De methodes zijn recent goed beschreven in "A microdialysis method to measure in vivo hydrogen peroxide and superoxide in various rodent tissues (La Favir *et al.* Methods 2016;109: 131-140)". De methodes worden op dit moment niet routinematig uitgevoerd, en zullen daarom eerst moeten worden getraind onder AVD247002016533.

Lever: buik en buikwand worden geopend zoals beschreven onder a) het ileum. De probe wordt lateraal door het midden van de meest oppervlakkige (mediale) lob ingebracht

Nier: buik en buikwand worden geopend zoals beschreven onder a) het ileum, aan de zijde waar de probe moet worden ingebracht worden de darmen voorzichtig op steriel vochtig gaas geplaatst. De probe wordt van inferior naar superior geplaatst, zodat het membraan in de schors gepositioneerd is.

Spier: de meest eenvoudige spier om te benaderen is de biceps femoris, vrijprepareren kan zoals beschreven voor de tibia (maar dan proximaal van het kniegewricht). De probe wordt in longitudinale richting door de spier geleid.

Pancreas: buik en buikwand geopend zoals beschreven onder a) het ileum. Darmen en lever worden voorzichtig aan de kant gelegd (op steriel vochtig gaas). De probe wordt lateraal door het midden van het orgaan ingebracht. Bij het inbrengen van de probe moet worden opgelet dat de poortader niet geraakt wordt.

De tubing waardoor het perfusaat van en naar het membraan stroomt kan worden samengebonden in een siliconen slang die het onderhuids tunnelen vereenvoudigd (één in plaats van twee tubings). Voor het onderhuids tunnelen wordt een lange stompe naald (12G) vanaf de kop naar de geopende buik-, hals- of nek-wond geleid. De tubing wordt door de naald terug gevoerd richting te kop van het dier. Voordat de probe wordt bevestigd, wordt de werking gecontroleerd door de probe te perfunderen. Op de kop worden met een trepan boor verdiepingen in de schedel geboord waar schroefjes in gezet kunnen worden waaraan de canule kan worden vastgezet. De canule wordt (eventueel) met een hiervoor ontworpen houder aan de schedel en de schroeven in de schedel vastgezet. Hiervoor wordt een biocompatibele polymeer gebruikt. Nadat de probes op de schedel zijn bevestigd wordt de hoofdhuid met individuele hechtingen gesloten

Wanneer het nodig is om een stof-concentratie in de verschillende compartimenten te bepalen kan er meer dan één probe worden geplaatst, om het aantal benodigde proefdieren te verminderen. Naast de hierboven beschreven probes kan er ook nog een intracerebrale probe worden geplaatst (methode volgens AVD247002015341), of kan er een katheter aangelegd in de bloedbaan, of een CSF canule in de cisterna magna.

- Voor het nemen van bloedmonsters (of bloeddialysaat monsters) worden de katheters geplaatst in bijvoorbeeld de vena-jugularis of vena-femoralis. Het uiteinde van de katheter wordt op het schedel bevestigd op vergelijkbare wijze als de microdialyse canules.
- Voor het nemen van CSF monsters wordt een canule geplaatst in de brain aqueduct of de cisterna magna, op dezelfde wijze als de plaatsing van de microdialyse canule (methode volgens

AVD247002015341).

Het aantal probes / canules per dier is beperkt:

- Sommige van de bovengenoemde operaties zijn zo ingrijpend, dat het plaatsen van een tweede of derde canule het risico op een verhoging van het ongerief te groot wordt, bijvoorbeeld bij de probe in het long epitheel
- Bepaalde canules kunnen alleen in rat worden geplaatst
- Het is fysiek niet mogelijk om meer dan 3 microdialyse probes op de schedel van een dier te plaatsen.

De uiteindelijke combinatie van diersoort, doelgebied en vraagstelling bepaalt hoeveel canules er geplaatst worden. De onderzoeker zal bij de IvD moeten onderbouwen dat er geen risico bestaat dat het ongerief voor het dier de classificering van deze aanvraag overstijgt.

- 2) Afhankelijk van de vraagstelling kan het dier na de operatie bijkomen, of meteen worden ingezet voor bemonstering onder anesthesie. Wanneer het dier bijkomt, wordt het geobserveerd om zeker te zijn dat er geen klinische tekenen van verminderd ongerief zijn. Wanneer de dieren volledig wakker zijn, eten en drinken worden zij individueel in een experimentele kooi gehuisvest, om te voorkomen dat ze aan elkaars probes gaan knagen. In de experimentele kooi wordt wederom het welzijn van de dieren gegecontroleerd tot enkele uren na bijkomen uit de operatie. Indien nodig (na operaties langer dan 60 minuten) krijgen de dieren de mogelijkheid op een verwarmde ondergrond te liggen en in suikerwater geweekt voer tot zich te nemen, om het herstel proces te bevorderen (op basis van het zogenaamde pamper protocol).
- 3) Experimenten worden uitgevoerd direct na operatie (onder anesthesie) of na één tot enkele dagen na operatie, om het dier voldoende gelegenheid te geven tot herstel (afgemeten aan algemene indruk van het dier en toenemend lichaamsgewicht). Tijdens het bemonsteren stroomt een iso-osmotische vloeistof door de canule, met een snelheid van 0.1 tot enkele microliters per minuut. De vloeistof monsters worden opgevangen en later doorgemeten. Uitkomst van de meting is de concentratie van biomarkers en/of de concentratie van de teststof. Er zijn voor deze experimenten verschillende ontwerpen mogelijk. Het meest eenvoudige ontwerp verloopt als volgt:
 - Operatie
 - Herstel
 - Stabilisatie van de microdialyse perfusie
 - Basale monsternamen microdialyse
 - Toediening stof / vehicle
 - Opvangen experimentele microdialyse monsters
 - Termineren, orgaan collectie en macroscopische controle van canule plaatsing

Voor de ontwikkeling van bepaalde modellen (bijvoorbeeld: voeding met potentiële pro-cognitieve eigenschappen) kan toediening van de test stof een aantal dagen tot weken voor de operatie starten.

De toediening kan één of meerdere teststoffen omvatten (afhankelijk van de vraagstelling). Bij vragen over werkingsmechanismen zal een gebalanceerd studie-ontwerp worden gehanteerd, bijvoorbeeld:

- Vehicle+vehicle
- Test-stof+vehicle
- Test-stof+(ant)agonist van de receptor
- Vehicle+(ant)agonist van de receptor

Farmacokinetische experimenten bestaan vaak uit toediening van enkele concentraties via verschillende routes bijvoorbeeld:

- Low dose, i.p.
- High dose, i.p.
- Low dose, p.o.

- High dose p.o.

Mogelijke toedieningsroutes van de teststoffen:

- lokaal door de probe (perfussie van het doelgebied)
- subcutaan
- intraperitoneaal
- intramusculair
- oraal (per gavage of in het dieet)
- rectaal
- intranasaal
- intraveneus (eventueel via geplaatste katheter)

Experimenten kunnen acuut, sub-chronisch of chronisch worden uitgevoerd, waarbij toedieningen en het verzamelen van microdialyse monsters over respectievelijk 1 dag, 3 tot 5 dagen of langer wordt gedaan.

Bij bepaalde experimenten kan naast het opvangen van monsters ook een niet invasieve gedragsmatige analyse informatie leveren over de werking van de stof (bijvoorbeeld locomotor activiteit). Gedragsmatige analyse van het dier is in ieder geval van belang om het welzijn van de dieren goed in te kunnen schatten.

Na de experimenten worden de dieren onder anesthesie getermineerd, zodat de relevante organen kunnen worden verwijderd om de plaatsing van de canule te verifiëren. Tevens kan er weefsel worden uitgenomen voor bepaling van test-stof accumulatie in verschillende organen. In enkele gevallen kan transcorticale perfusie onderdeel uitmaken van het terminatie protocol, wanneer post-mortem weefsel zonder bloed moet worden uitgenomen.

- 4) Als controle aanvulling en alternatief voor microdialyse is het mogelijk om de dieren een test-stof toe te dienen en ze op een specifiek tijdstip na toediening te termineren. Aangezien deze methode per tijdstip een groep dieren vereist is het van groot belang de keuze voor een dergelijke studieaanpak goed te motiveren en het aantal nodige monsters te minimaliseren (door een minimum aan tijdstippen en doseringen te testen). Na termineren van de dieren worden de organen uitgenomen en gehomogeniseerd.

Vraagstellingen waarbij deze methode een toegepast moet worden zijn bijvoorbeeld:

- Vergelijking met eerdere data (wanneer terminale samples alleen niet zouden volstaan)
- Wanneer het niet mogelijk is in microdialyse monsters de concentratie van de bio-marker te bepalen, door contaminaties of wanneer wordt gekeken naar eiwit aggregaten
- Wanneer een totale exposure intra- en extra-celair; vrij en gebonden moet worden vergeleken met de vrije fractie bepaald met microdialyse.

- 5) Alle verzamelde monsters worden met behulp van HPLC gekoppeld met massaspectrometrie of ELISA gemeten om de concentratie van de test-stof en bio-marker(s) te bepalen.

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

Op basis van power analyse en statistische post-hoc analyse is in het verleden de benodigde groepsgrootte voor cerebrale microdialyse bepaald. Deze loopt uiteen van 4 tot 12 dieren per dosering (afhankelijk van de variatie in de concentratie van de te bepalen bio-marker of teststof). Op basis van eerdere ervaring met perifere microdialyse en literatuurstudie is te verwachten dat de variatie voor de meeste biomarker concentraties niet veel anders zal zijn.

- Voor farmacokinetische studies met behulp van een ultra langzame flow (in onze gepatenteerde metaquant) zijn minimaal data van 4 dieren nodig
- Voor de meeste klein-moleculaire stabiele biomarkers zijn 5 tot 6 dieren per dosering voldoende
- Voor biomarkers waarvan bekend is dat basale concentraties sterk variëren, zijn 7 tot 12 dieren nodig

Voor niet eerder geteste of bestudeerde biomarkers zou op basis van een pilot-studie de bioanalytische variatie moeten worden bepaald alvorens een goede power analyse kan worden uitgevoerd. Bij microdialyse in perifere systemen moet rekening gehouden worden met een hogere uitval door verhoogd risico op

ongerief doordat de chirurgische ingrepen complexer zijn en ingrijpender voor het dier. Op basis van onze ervaringen in het verleden ligt deze uitval tussen de 15% (vergelijkbaar met microdialyse in het centraal zenuw stelsel) en de 30% bij ingrepen waarbij de operatie zelf een verhoogd risico op humane eindpunten heeft (bijvoorbeeld de long of medullae spinalis operaties).

B. De dieren

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

Voor deze experimenten kan gebruik gemaakt worden van ratten of muizen. De keuze van diersoort en geslacht voor de individuele protocollen is afhankelijk van:

- de vraagstelling van de cliënt: deze onderzoekt een stof vaak op meerdere modellen (bijvoorbeeld naast farmacologische studies ook toxicologische studies), waarbij de waarde van de gezamenlijke resultaten het sterkste is wanneer diersoort, sub-species en geslacht van de verschillende experimenten overeen komen.
- de expressie van bepaalde receptor sub-types die in de ene diersoort wel en de andere niet voor zouden komen
- het doelorgaan: de procedures zoals beschreven in paragraaf 2A (handelingen) zijn vanwege orgaan grootte niet allemaal uitvoerbaar in muizen. De procedures beschreven onder: c) de medullae spinalis, d) longepitheel weefsel en f) beenmerg van de tibia zijn alleen uitvoerbaar in ratten.

Dieren zullen in alle gevallen van erkende breedters worden betrokken. In de meeste gevallen (ongeveer 90 %, op basis van experimenten in het verleden) zal worden gewerkt met jong volwassen mannelijke dieren, op verzoek van de cliënt. Wij nemen de mogelijkheid van gebruik van vrouwelijke dieren mee in de discussie met onze cliënten.

In specifieke gevallen is het zinvol om een farmacon te testen in een passend (genetisch) pathologie model voor de ziekte waartegen het potentiële geneesmiddel is gericht. Voorbeelden van toepasselijke modellen zijn:

- Cardiovasculair: hiervoor bestaan een aantal (spontaan) hypertensive dier modellen (bijvoorbeeld ApoE muis, FHH en SHR ratten)
- Diabetes/metabole ziekten: deze modellen zijn vaak geïnduceerd door dieet, maar kunnen ook spontaan diabetes verschijnselen of metabole ziekten ontwikkelen. (bijvoorbeeld: Zucker rat en NOD muizen)
- Inflammatie: In veel gevallen is de inflammatie accuut op te wekken door middel van infusie of injectie van bijvoorbeeld Bz-ATP, formaline of LPS
- Longziekten: COPD model door LPS of bleomycine toediening of genetische modellen voor cystische fibrose

De cliënt kan om een ander dan hierboven genoemd passend model vragen voor een specifieke aandoening. In een dergelijk geval zouden wij ook andere modellen kunnen testen. Bij gebruik van een dergelijk model mag het potentiële intrinsieke ongerief van het model de aan het experiment verbonden ongerief-klassificatie niet overstijgen. Hierbij moet ook rekening worden gehouden met de complexiteit en ingrijpendheid van de operationele handeling. Toetsing van het intrinsieke en cumulatieve ongerief zal in alle gevallen, dus ook bij experimenten met alleen wildtype dieren gebeuren door de IvD met ondersteuning van experts die bekend zijn met het model.

Geschatte aantallen: wij verwachten op jaarbasis 8-10 nieuwe verbindingen te gaan testen (op basis van 3 studie aanvragen in de afgelopen 3 maanden, en op basis van aanvragen uit het verleden). Voor elke stof zullen één of meer doseringen en een vehicle getest moeten worden (ongeveer 4 groepen zoals hierboven beschreven). Met een gemiddelde van $7-8 \times 1.3 = 11$ dieren per groep (op basis van onder A genoemde verdeling en een uitval van 30%) verwachten wij dat we 10 (stoffen) $\times 4$ (groepen) $\times 11$ (dieren per groep) $\times 5$ (jaar) = 2200 dieren nodig hebben voor deze experimenten.

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 kinetiek van moleculen wordt in grote mate bepaald door de doorbloeding van de organen en door de resorptie, verdeling, biotransformatie en uitscheiding (ADME). Het is op dit moment niet mogelijk om al deze activiteiten van het intacte levende organisme na te bootsen in één model. Daarnaast is de farmacodynamiek afhankelijk van zowel de lokale concentratie van de test-stof, als het expressie-niveau van de receptoren. De natuurlijke variatie hiervan is buiten een intact organisme moeilijk na te bootsen. Ondanks dat zoveel mogelijk informatie uit voorafgaande *in-vitro* en *in-vivo* studies wordt gehaald, kunnen potentiële bijwerkingen naar voren komen die niet eerder zijn vastgesteld. Daarnaast kan het zijn dat de stof in het lichaam een secundair effect levert (off-target effect), waardoor de *in-vitro* gemeten reactie niet plaatsvindt, wordt geremd of versterkt. Vervanging van deze experimenten is daarmee slechts ten dele mogelijk en zal nooit een compleet overzicht geven van de verdeling en het effect van een stof.

Vermindering

- Toepassing van de microdialyse techniek levert in zichzelf een enorme vermindering van het benodigde aantal proefdieren, in vergelijking met studies waar een aantal dieren per tijdstip geofferd moet worden.
- Het aantal bio-markers dat uit één enkel monster kan worden bepaald is in relatief korte tijd sterk toegenomen. Wij zetten ons actief voor het ontwikkelen van steeds nieuwe analyse methoden om meer informatie uit één monster te kunnen nemen, waardoor er minder monsters per tijdstip en daarmee minder dieren nodig zijn.
- Doordat de dieren fungeren als hun eigen interne controle (door het nemen van basale monsters) wordt de intra-dier variatie kleiner (effecten kunnen als relatief ten opzichte van basaal worden uitgedrukt). Dit vermindert het aantal dieren dat nodig is om een goede statistische analyse te kunnen doen.
- Door een goed studie ontwerp kunnen dieraantallen verder verminderd worden. Hiervoor gaan wij actief in gesprek met de cliënt om bijvoorbeeld te zorgen dat wanneer er meer dan één stof wordt getest het vehiculum gelijk blijft, zodat er niet voor elke stof een nieuwe controle groep nodig is.

Verfijning:

- De experimenten worden gerandomiseerd en deels geblindeerd uitgevoerd. Zo ontstaan er geen intra-dag effecten of effecten geïnduceerd door verwachtingen (observer bias)
- Microdialyse is een methode om stressvrij samples over een langere periode te kunnen nemen uit hetzelfde dier. Afgezien van de operatieve ingreep ontstaat er weinig weefsel-trauma door de microdialyse probe zelf. Het weefsel waarin gemeten wordt is nagenoeg intact en functioneel in een "native" context.
- Test stoffen zijn altijd eerst *in-vitro* onderzocht voordat ze *in-vivo* worden getest, om zeker te zijn van de beoogde interactie met de betrokken receptor.
- Medewerkers zijn goed getraind in de operatieve vaardigheden (AVD247002016533) en in observatie van ongerief en pijn uitingen na operatie of toediening. Eventueel geconstateerd ongemak zal verminderd kunnen worden door toepassing van adequate pijnpreventie en pijnbestrijding of eventueel toepassing van humane eindpunten. Apparatuur wordt goed onderhouden en tijdig vervangen

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 dieren worden na de operatie minimaal twee maal per dag gemonitord. Voor metingen in het long-epitheel worden de dieren zelfs tot vier maal daags (ook 's nachts) gemonitord tussen operatie en monstercollectie. Hierbij wordt gekeken naar:

- wond-genezing
- algemeen herstel na operatie
- gewicht van het dier
- algemene uiterlijke kenmerken duidend op ongerief (pijn, lijden of angst)

Op basis van tot nu toe uitgevoerde experimenten beperkt het ongerief zich tot herstel na de operatie

(bijkomen uit de anesthesie) en zijn er geen nadelige gevolgen waargenomen van de aanwezigheid van de probes.

Na toediening van de teststof worden de dieren geobserveerd voor de duur van de monsternamen. Indien monsternamen (sub-)chronisch plaats vindt worden de dieren tussen de monsternamen ook gecontroleerd op basis van bovengenoemde kenmerken en eventueel aanvullende kenmerken, samenhangend met het experimentele protocol.

Milieueffecten: n.v.t.

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.

In de meeste gevallen gaat het om potentieel nieuwe geneesmiddelen, of nieuwe toepassingen van bestaande geneesmiddelen. Cliënten die ons vragen de experimenten uit te voeren doen dit 1) vanwege onze expertise en 2) omdat de mogelijkheden om binnen de eigen instelling deze experimenten uit te voeren, niet aanwezig zijn. Dit betekent dat deze experimenten vaak voor het eerst door ons worden uitgevoerd. Door goede kennis van de literatuur worden duplicaat experimenten zoveel mogelijk voorkomen - hoewel ook van belang is dat in bepaalde gevallen ter validatie van een model of test - methodes juist wel replicatie van eerder gepubliceerd werk plaatsvindt

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.

De operatie voor het inbrengen van de microdialyse canule is invasief. Vooral het vrijprepareren van het doelweefsel zou na bijkomen uit de anesthesie nog pijn kunnen veroorzaken bij de dieren. Pijnverlichting vindt plaats door toediening van een langwerkend systemisch analgeticum en topicale analgesie op de plaats van incisie. In geval van metingen in het long-epitheel ontvangen de dieren post-operatief additionele analgesie op basis van observaties die tijdens het monitoren worden gedaan. Het regime moet zeer nauwkeurig op het dier worden afgestemd, om onderdosering maar vooral ook overdosering en daarmee ademdepressie te voorkomen.

Optimale pijnbestrijding na de operatie wordt gecontroleerd op basis van uiterlijk en gedrag van de dieren (er is een beslisboom ongerief en humane eindpunten en opgesteld). Na zware operaties kunnen de dieren waar nodig extra worden behandeld met analgetica, in de meeste gevallen volstaat echter toepassing van het zogenaamde pampier protocol, waarbij de dieren (naast rust) warmte, weekvoer en solid drinkt (of sucrose water) kan worden aangeboden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1) Gebaseerd op tot nu toe uitgevoerde proeven zal de te verwachten uitval 15% tot 30% zijn. De variatie in de uitval komt doordat de ingrijpendheid van de operaties nogal verschilt. Een probe in de jugularis inbrengen heeft een uitval van maximaal 15% bij operaties voor long epitheel loopt dit op tot rond de 30%.
- 2) Bijkomen uit anesthesie is een bekende oorzaak van stress voor de dieren, ook hierbij speelt de ingrijpendheid en lengte van de uitgevoerde operatie een rol. Postoperatief herstel zal na een operatie in de abdominale streek langer zijn dan na plaatsing van een probe in de jugularis.
- 3) Na operatie worden de dieren individueel gehuisvest om te voorkomen dat zij elkaars canules of chirurgische wonden beschadigen bij sociale interacties. Individuele huisvesting is een bekende vorm van verminderd dierenwelzijn en moet zo beperkt mogelijk worden ingezet.
- 4) Potentiele welzijns aantasting kan ook komen van de te testen stoffen, deze kunnen ondanks eerdere *in-vitro* en *in-vivo* testen nog onbekende bijwerkingen vertonen.
- 5) Toepassing van diermodellen met een intrinsiek ongerief heeft gevolgen voor het welzijn van de dieren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- 1) Belangrijkste oorzaken voor uitval zijn:
 - Onvoorziene complicaties tijdens of ten gevolge van de operatie
 - Technische problemen met de canule voor of tijdens het experiment
 - Het voortijdig moeten beëindigen van de monsternamen
- 2) Oorzaken voor ongerief bij bijkomen uit anesthesie zijn gerelateerd aan de tijdelijk veranderde fysiologie van het lichaam, het lichaam heeft een aantal uren nodig om homeostase te bereiken. Postoperatief herstel is afhankelijk van de ingrijpendheid en de duur van de operatie.
- 3) Het knagen aan canules heeft te maken met normaal sociaal gedrag van de dieren, dit is moeilijk anders tegen te gaan dan door individuele huisvesting. De dieren worden wel gehuisvest in dezelfde experimentele ruimte en hebben zo in ieder geval nog hoor- en reukcontact.
- 4) Oorzaak voor het onbekend zijn van mogelijke bijwerkingen is dat de stoffen die getest zullen worden over het algemeen niet uitgebreid zijn toegepast in mens of dier. Daarmee is het vaak niet mogelijk alle potentiele bijwerkingen te kennen. Indien een stof ongewenste bijwerkingen vertoont in studies wordt deze uiteraard niet toegelaten tot verdere testen.
- 5) Diermodellen zijn ontwikkeld om specifieke kenmerken van een ziekte na te bootsen, wanneer de ziekte ongerief symptomen laat zien, kunnen deze in een goed model ook tot uiting komen.

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

- 1) Technische problemen aan de probes worden zoveel mogelijk vermeden door de probes in een zo laat mogelijk stadium in te brengen en door in-situ op werkzaamheid te controleren. Complicaties tijdens en ten gevolge van de operaties worden zoveel mogelijk vermeden door goede training van de medewerkers die de operatie uitvoeren. Dergelijke trainingen vinden altijd plaats met minimaal 2

medewerkers, waarvan één ruime operatieve ervaring heeft. Trainingen voor operatieve ingrepen vinden in principe plaats onder terminale condities onder vergunning AVD247002016533.

- 2) Het bereiken van homeostase wordt ondersteund door de dieren tijdens en na de operatie goed op temperatuur te houden met een regelbare warmtemat. De vochtbalans wordt aangevuld middels fysiologisch zout (s.c.).
Bijkomen uit anesthesie gebeurt in een rustige (verwarmde) omgeving. Met makkelijk toegankelijk voedsel en water, en indien nodig een verhoogd zuurstof niveau. De dieren worden regelmatig gecontroleerd tot ze fit genoeg zijn (wakker, eten en drinken) om in hun experimentele kooi te worden geplaatst. Bij meer complexe of ingrijpende operaties worden de dieren vaker en langer gecontroleerd en volgens het pampering protocol ondersteund. De periode van post-operatief herstel wordt aangepast aan de zwaarte van de ingreep. Het ongemak bij de proefdieren zal verder verminderd kunnen worden bij het gebruik van adequate pijnpreventie, pijnherkenning en pijnbestrijding, en indien nodig door toepassing van humane eindpunten.
- 3) Dieren in (sub-)chronische experimenten, of dieren die een langere periode van herstel nodig hebben na operatie worden gehuisvest in een speciaal ontworpen sociale "individual-group-housing-cage". Deze huisvesting behoudt de mogelijkheid tot olfactorische, auditieve en visuele interacties, maar beperkt fysiek contact. Daarnaast wordt altijd kooiverrijking aangeboden aan de dieren.
- 4) Bij de cliënt wordt altijd navraag gedaan naar resultaten van *in-vitro* en *in-vivo* studies waarbij de stof in vergelijkbare concentraties is toegediend.
- 5) Diepgaande kennis van het betrokken diermodel is erg belangrijk om een goede inschatting te maken van het intrinsieke ongerief van de dieren. Kennis van het model kan worden verhoogd door gebruik te maken van een GA passport zoals voorgesteld door de RSPCA in 2010. De noodzaak van inzet van pathologische diermodellen wordt vooraf in detail met de cliënt besproken. Het gedrag van de dieren wordt tijdens en voor experimenten geobserveerd om vroegtijdig te kunnen ingrijpen bij ongerief. We hanteren een 'beslisboom' over ongerief waarbij op basis van verschillende symptomen kan worden besloten een experiment vroegtijdig te beëindigen.

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.

Tijdens de operatie: niet meer zelfstandig ademen na een periode van ademhalingsondersteuning, convulsies, sterke bloedingen.

Tijdens herstel en het experiment: het incidenteel loskomen van hechtingen, canules en/of katheters. Algehele slechte conditie van het dier na operatie (scoring op basis van beslisboom op parameters zoals gedrag, gewicht (>15% gewichtsverlies), vacht, oogkleur en huidskleur en eventueel lichaamstemperatuur, waarneembare uitingen van pijn (zoals slecht eten/drinken, stereotypisch gedrag, pica-gedrag of vocaliseren).

Na plaatsing van de probe in het ruggenmerg zijn verschijnselen van verlamming of uitval door beschadiging van de zenuwen een mogelijke reden tot het toepassen van een humaan eindpunt. Voor dit type operatie is ook het continu verlies van CSF door de opening in het occipitaal membraan een reden tot het toepassen van een humaan eindpunt (deze situatie heeft zich tot nog toe nooit voorgedaan, maar kan niet volledig worden uitgesloten).

Na de long-epitheel operaties wordt in het bijzonder ook de ademhalingsfrequentie en diepte gecontroleerd in combinatie met de zuurstofsaturatie van het bloed. Wanneer een dier langer dan 5 minuten een saturatie van minder dan 80% (ernstige hypoxie) wordt een humaan eindpunt toegepast. Dit op basis van vergelijking met anoxische humane neonaten waarbij 5 minuten als kritische grens wordt gerekend voor hersenbeschadiging.

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

Bij plaatsing van een probe in de jugularis, bot of spieren minder dan 5%

Bij operaties in het abdominale gebied kan dit oplopen tot 10%

Bij plaatsing van de probe in het long-epitheel zelfs tot 20%, omdat tijdens het herstel toedienen van additionele analgetica van belang is, deze hebben echter vaak als nadeel dat er ademhalingsdepressie op kan treden. In combinatie met de ingebrachte guide kan dit leiden tot hypoxie. Zowel langdurige ernstige hypoxie als uitingen van pijn zijn redenen voor een humaan eindpunt. Het behandelen van de dieren vereist

duis uitgebreide en regelmatige controle.

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.

De volgende aspecten van deze experimenten zijn meegenomen in de overweging voor de ongerief classificatie:

- Onder narcose brengen (licht)
- Inbrengen van de canule(s) en katheters (licht tot matig (in het abdominale gebied))
- Bijkomen uit algehele narcose (matig)
- Postoperatieve pijn en ongemak (matig)
- Postoperatieve solitaire huisvesting (licht bij acute experimenten)
- Aansluiten van de rat aan de microperfusie pomp en het bloedsamplingsysteem (licht)
- Toedienen van de experimentele stof (licht)
- Toedienen van een overdosis pentobarbital onder anesthesie bij opoffering (licht)

Grof geschat zal 15-25% van de experimenten licht ongerief veroorzaken (dieren die worden getermineerd op een bepaald tijdstip na stof toediening)

De rest van de dieren zal matig ongerief ervaren, dit geldt voor alle dieren waar een probe wordt geplaatst.

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.

Om na te gaan of de canule in het juiste doelweefsel is geplaatst moet dit weefsel terminaal worden vrijgeprepareerd en uitgenomen, zodat macroscopische analyse van plaatsing kan worden gedaan. Voor de experimenten waar in detail naar biodistributie gekeken zal worden zullen zelfs meerdere organen verwijderd moeten worden.

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

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.

Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD247002016779**
 2. Titel van het project: **Perifere farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen.**
 3. Titel van de NTS: **Toepassing van perifere microdialyse voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen.**
 4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning**
 5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **DEC-RUG**
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
 6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: **11-01-2017**
 - aanvraag compleet: **11-01-2017**
 - in vergadering besproken: **19-01-2017**
 - anderszins behandeld: **06-02-2017**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **23-01-2017 tot 02-02-2017**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **02-02-2017**
 - advies aan CCD: **16-02-2017**
 7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
De IvD heeft aangegeven dat de aanvraag met de IvD is afgestemd.
- Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.*
8. Eventueel horen van aanvrager: **n.v.t.**
 - Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrekt(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag
 9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum: **23-01-2017**

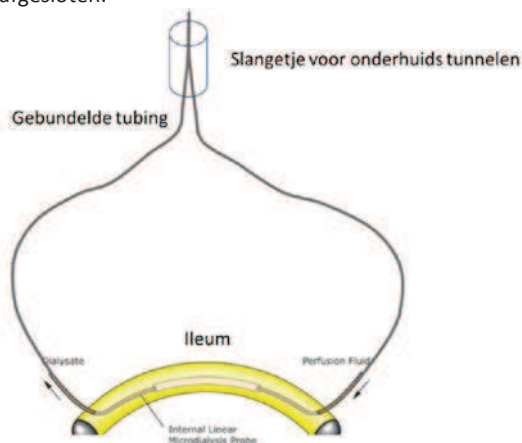
Gestelde vraag/vragen:

1. Pag 2, alinea a, regel 7 (ileum) noemt 'transversale probe'. Wat is dat? (en is dan een gewone dialyse probe een longitudinale probe?) De uiteinden van die transversale worden met een slangetje 'gebundeld'. Hoe werkt dat?
2. Pag 3, 1e alinea (ruggemerg): zijn er nog maatregelen mogelijk om potentieel lekken van CSF te stoppen – en hoe vaak komt dat naar verwachting voor?
3. Pag 3, alinea d (longweefsel). Hoe weet je dat de probe, geïntroduceerd via de trachea, in het longepitheel terecht komt? Overigens, het is toch niet de nek, maar de hals waar de operatie begint?
4. Pag 3, alinea c (tumortransplantaten). Deze worden benaderd met een transversale probe of een Y-vormige probe. Dit laatste klinkt eerder als bemonstering dan als microdialyse. Gaarne enige nadere uitleg.
5. Pag 3, f: 'periost wordt op passende wijze verdoofd' – maar het dier is toch al onder algehele narcose?
6. Pag 4, 2e alinea: 'tubing met dialyse-membraan (eventueel via een probe-inlet en outlet). Zijn er dan dialyse-probes zonder in- en outlet – en hoe werkt dat dan?
6. Pag 4, alinea 4/5: ..tot 3 microdialyse-probes in één dier? Dat wordt druk op die schedel.
7. Pag 7, midden: in totaal 2200 ratten/muizen in 5 jaar. Alleen al dit beperkte aantal voor al die studies geeft aan hoe proefdierbesparend de microdialyse-techniek in vrij bewegende dieren is. Is het overigens niet verstandig om aan te geven welke van de beschreven technieken al in de muis operationeel zijn?

- Datum antwoord: **02-02-2017**

- Verstrek(e) antwoord(en):

1./ Het gebruik van de term transversaal is mogelijk wat verwarrend in dit geval. De transversale probe is, net als een longitudinale probe, één doorlopende tubing met in het midden een hol membraan. De tubing voor het membraan voert de dialyse vloeistof aan die vervolgens langs de binnenzijde van het holle membraan stroomt. De vloeistof wordt daarna afgevoerd via de tubing achter het membraan. De terminologie transversaal duidt vooral op het feit dat de probe zo wordt gepositioneerd dat de aanvoerende tubing vanaf de linkerzijde in het ileum wordt ingebracht, en de afvoerende tubing aan de rechterzijde weer naar buiten komt. De twee uiteinden worden voorzichtig naar elkaar toegebogen, zodat er geen knik in de tubing of darm ontstaat. Op enige afstand (3-4 cm) van het membraan zelf kunnen de uiteinden dan bij elkaar worden gebracht en vandaaruit omgeven door een slangetje worden gebundeld. Een schematische tekening is bijgevoegd. De "gewone" microdialyse probe voor in de hersenen noemen we I of Y vormig, bij dit type probe bevinden aanvoerende en afvoerde tubing zich aan dezelfde zijde van het holle membraan. De andere zijde van het holle membraan is dan met een lijmprop afgesloten.



2. Met behulp van de tip van een naald wordt eerst een opening in het occipitaal membraan gemaakt. Tijdens het inbrengen van de microdialyse probe blijft het occipitaal membraan intact, maar komen kleine hoeveelheden CSF via de opening naar buiten 0-10 µL (geschat volume). Een enkele keer hebben we meegemaakt dat volume groter was. In deze gevallen was het voldoende om het tissue te laten rusten en het occipitaal membraan te laten sluiten om de probe (eventueel met wat druk met een steriel wattenstaafje). Uit eerdere experimenten weten we dat deze hoeveelheden niet schadelijk zijn en ook binnen enkele uren worden aangevuld. Wel is het zo dat het ongerief na de operatie ook kenmerken van hoofdpijn kunnen geven (vergelijkbaar aan hoofdpijn die wordt ervaren door patiënten na lumbaal-punctie), deze pijn wordt bestreden door voor de operatie Fynadine te geven (ook om gevolgen van de incisie gedurende langere tijd te onderdrukken). Lekken die niet sluiten hebben wij nog niet geobserveerd, maar zouden moeten leiden tot toepassing van een humaan eindpunt (toegevoegd aan relevante paragraaf in de bijlage). Deze situatie heeft zich echter niet eerder voorgedaan, daarom is het moeilijk in te schatten hoe vaak een dergelijke situatie zich voor zou doen. Op basis van tot nu toe uitgevoerde experimenten is het veilig te zeggen dat het gaat om minder dan 5% van de gevallen. Te allen tijde is het juist met

dit type operatie van belang het dier te voorzien van voldoende vloeistof om eventuele verliezen te compenseren.

3. Op basis van histologische onderzoek aan de longen uit eerdere experimenten kunnen we met zekerheid zeggen dat de probe inderdaad in het longepitheel terecht komt. Tevens heeft de literatuur (op basis waarvan wij de oorspronkelijke experimenten hebben ontworpen) dit ook laten zien. Het basale lamina en onderliggende weefsel zijn waarschijnlijk te stevig voor de probe om te doordringen. De opmerking betreffende de nek/hals is volledig correct, dit is aangepast in de bijlage.

4. Wederom kan hier in plaats van transversale probe longitudinale probe worden gelezen. De Y-vormige probe is de meer klassieke probe vorm. Afhankelijk van de locatie van het transplantaat (meer dorsaal kan een Y-vormige probe worden toegepast), meer ventraal is het toepassen van een transversale probe geschikter. De keuze is ook afhankelijk van het te bestuderen analiet: bio-marker of test-stof, in het laatste geval is toepassing van een zogenaamde MetaQuant probe het meest praktisch, van dit type probe is echter nog geen transversale versie beschikbaar. In alle gevallen gaat het dus nog steeds om het opvangen van microdialyse monsters waarin concentraties van een test-stof/analieten kunnen worden bepaald. In de bijlage is de term klassieke microdialyse probe toegevoegd.

5. Deze opmerking is geheel terecht, het gaat hier om lokale analgesie en niet om anesthesie. De aanvraag is op dit punt aangepast.

6. Deze opmerking heeft ook te maken met het verschil tussen de klassieke Y of I vormige probe en de longitudinale/transversale probe. Bij de klassieke probe wordt de tubing via een inlet verbonden met het laatste gedeelte van de tubing die de perfusievloeistof bij het membraan aflevert, waarna de vloeistof verder stroomt naar de outlet die verbonden is met tubing. De tubing wordt in dit geval apart aan de in- of outlet aangesloten. Bij de longitudinale probe is het membraan direct met de tubing verlijmd en hoeft de tubing dus niet nog via een in- en outlet verbonden. De aanvraag wordt op dit punt herschreven om deze interpretatie te voorkomen.

7. Op dit moment voeren wij onder AVD247002015341 experimenten uit waar twee microdialyse probes en één uiteinde van een jugularis canule op het hoofd van het dier worden bevestigd. Daarvoor is voldoende ruimte op de schedel. Wij hebben na overleg met de IvD dan ook bewust gekozen om dit maximum ook in deze aanvraag vast te leggen.

8. Bij de beschrijving van de handelingen hebben we beschreven welke technieken wel en niet toepasbaar zouden zijn in de muis, het zou zinvol kunnen zijn om dat nogmaals kort te herhalen op pagina 7. Deze informatie is aan de aanvraag toegevoegd.

- **De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag**

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

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? **Ja**
2. Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.
Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.

3. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag

4. Is de DEC competent om hierover te adviseren? Ja

5. 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 ten doel om door middel van microdialyse technieken de lokale biologische beschikbaarheid van potentiële geneesmiddelen en hun metabolieten in perifere orgaan/weefsel systemen van een vrij bewegend dier te bepalen, en tegelijkertijd potentiële negatieve (off-target) effecten te identificeren. De argumenten waarom en de translationele meerwaarde worden adequaat belicht. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. Gezien de expertise die de betreffende CRO heeft m.b.t. de ontwikkeling en toepassing van microdialyse in permanent geïstrumenteerde dieren, vertrouwt de DEC erop dat de aanvrager bij de uitvoering van de experimenten op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang ervan en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en dat de doelstellingen voldoende samenhang hebben..

2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Flora- en faunawet).

Voor zover de DEC de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere relevante wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. **De doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.**

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het directe doel is om zowel kwantitatief als kwalitatief de concentratie c.q. identificatie van potentiële geneesmiddelen en hun metabolieten tijdsafhankelijk op lokaal niveau in specifieke weefsels/organen te bepalen. Het uiteindelijke doel is om met de verkregen data de lokale biologische beschikbaarheid van het potentiële geneesmiddel in de patiënt met grotere zekerheid te kunnen voorspellen.

Er is een directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel. Het uiteindelijke doel zal waarschijnlijk binnen de looptijd van het project niet gehaald worden. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat dit project kan bijdragen aan het onderzoeksveld en het directe doel is dus gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

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

De belangrijkste belanghebbenden in dit translationele/toegepaste project, dat gericht is op de lokale bepaling, kwantitatief en kwalitatief, van farmaca en hun metabolieten in perifere orgaan/weefsel systemen zijn de proefdieren, en de doelgroep/patiënt en diens naasten.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de integriteit van de dieren zal worden aangetast, de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en ongerief ondergaan.

Waarden die voor patiënten bevorderd kunnen worden: de gezondheid van patiënten kan hierdoor verbeterd worden. Hierdoor kan de kwaliteit van leven verbeterd worden van patiënten en van hun naasten.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen.
Voor zover de DEC de effecten op het milieu kan beoordelen is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu te betrekken. De DEC wil wel voorstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*). **Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output alsmede de aandacht voor de drie V's**
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. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*). **De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet is logisch en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.**

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en of de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de Dierproeven (Wod). voor de desbetreffende categorie genoemde

beperkende voorwaarden. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*). **N.v.t.**

- 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. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan, omdat het, om redenen van dierenwelzijn of diergezondheid of om wetenschappelijke redenen, noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht uw beoordeling toe. **De DEC heeft zich ervan verzekerd dat huisvesting en verzorging volgens de richtlijn gebeurt. Dit op basis van de daartoe strekkende verklaring van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 van de ondertekening van de aanvraag en punt F van de bijlage.**

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). **De DEC vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.**

12. Het uitvoeren van dierproeven zal naast het ongerief vaak gepaard gaan met aantasting van de integriteit van het dier. Beschrijf op welke wijze er sprake is van aantasting van integriteit. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*). **De integriteit van het dier wordt aangetast door het implanteren van o.m. microdialyse probes, het toedienen van farmaca, van anesthetica en – zo nodig – van analgetica.**

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Naar de mening van de DEC zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig aangegeven in de projectaanvraag.

3V's

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De complexe omstandigheden voor het vaststellen van de lokale biologische beschikbaarheid in organen/weefsels van een dier is in vitro niet na te bootsen.**

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Naar de mening van de DEC is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat, zulks mede gebaseerd op de door de aanvrager aangeleverde literatuur referenties.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Hierbij heeft de DEC onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.

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

Voor zover de DEC kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat en mede gezien het daartoe strekkende antwoord van de aanvrager in de projectaanvraag heeft de DEC reden aan te nemen dat onnodige duplicatie achterwege blijft.

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. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

In onderhavige projectaanvraag, waarin elf verschillende organen/weefsels als target worden besproken om de lokale biologische beschikbaarheid van farmaca en hun metabolieten te bepalen c.q. te identificeren, wordt terecht geen voorkeur voor een geslacht uitgesproken omdat een eventuele voorkeur afhangt van a) het specifieke te onderzoeken farmacon, en b) van het specifieke doelorgaan waarop het farmacon aangrijpt. Alhoewel de DEC-RUG vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en de aanvrager kortgesloten dient te worden daar de DEC niet betrokken is bij de fok en de aankoop van proefdieren.

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

toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

Naar de mening van de DEC is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager.

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

NTS

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

Naar de mening van de DEC is zulks het geval.

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project "Perifere farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen", dat gericht is op de bepaling van de lokale biologische beschikbaarheid van potentiële geneesmiddelen en hun metabolieten en van eventuele biomarkers in organen en weefsels het lichte-matige ongerief, dat de ratten/muizen wordt aangedaan in het onderhavige project?

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. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel. Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (Zie *Praktische handreiking ETK: Stap 3.B*; zie bijlage I voor voorbeelden).

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: matig ongerief.

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: mogelijk groot voordeel voor patiënten.

Algemeen: vergroting van medische kennis met betrekking tot de specifieke lokale biologische beschikbaarheid en werkzaamheid van potentiële nieuwe geneesmiddelen en een bijdrage aan verbeterde gezondheidszorg.

De DEC-RUG is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten en hun naasten in het bijzonder binnen het project "Perifere farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na licht-matig ongerief, tot de dood. Zij worden door de experimenten in hun welzijn geschaad. Ten gevolge van de proeven zullen de dieren stress ondervinden. De integriteit van de dieren zal worden aangetast door het

implanteren van o.m. microdialyse probes, het toedienen van farmaca, anesthetica en analgetica en de opoffering aan het eind van de proeven.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter kunnen leiden tot een relevante uitbreiding van medisch-wetenschappelijke kennis over de specifieke lokale biologische beschikbaarheid en werkzaamheid van potentiële nieuwe geneesmiddelen in (doel)organen en –weefsels.

Vandaar dat de DEC-RUG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk als vanuit maatschappelijk oogpunt, van reëel belang acht. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het welzijn van de dieren te bevorderen, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

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). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld).

De DEC-RUG beantwoordt de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project "Perifere farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen", dat gericht is op het verkrijgen van inzicht in de specifieke lokale biologische beschikbaarheid en werkzaamheid van potentiële nieuwe geneesmiddelen in (doel)organen en –weefsels, de opoffering en het lichte-matige ongerief, dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project, bevestigend.

Hoewel de DEC-RUG de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergaan ongerief van de proefdieren, weegt het reële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-RUG 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 doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise, zoals ook blijkt uit de vermelde uitnodiging van de FDA aan de wetenschappelijk directeur van het bedrijf om begin 2017 een presentatie te geven over de betekenis van microdialyse technieken in het geneesmiddelonderzoek. Er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De DEC-RUG is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC-RUG is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd.

Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-RUG de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Perifere farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen " als ethisch gerechtvaardigd en voorziet derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**
2. Het uitgebrachte advies is kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

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*).

N.v.t. De DEC is overigens niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Brains-On-Line

De Mudden 16
9747 AW GRONINGEN



**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
AVD247002016779

Bijlagen

2

Datum 19 december 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 5 december 2016. Het gaat om uw project "Perifere farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD247002016779. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

19 december 2016

Aanvraagnummer:

AVD247002016779

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
19 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD247002016779

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA:	24700
Naam instelling of organisatie:	Brains-On-Line
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde:	[REDACTED]
KvK-nummer:	2094714
Straat en huisnummer:	De Mudden 16
Postcode en plaats:	9747 AW GRONINGEN
IBAN:	NL59INGB0681766174
Tenaamstelling van het rekeningnummer:	Brains On-Line B.V.

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
19 december 2016
Aanvraagnummer:
AVD247002016779

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: [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: 31 januari 2022
Titel project: Perifere farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen.
Titel niet-technische samenvatting: Toepassing van perifere microdialyse voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen.
Naam DEC: Rijksuniversiteit Groningen
Postadres DEC: Antonius Deusinglaan 1, [REDACTED] 9713 AV Groningen
E-mailadres DEC: secrdec@umcg.nl

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: GRONINGEN
Datum: 5 december 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Brains-On-Line

De Mudden 16
9747 AW GRONINGEN



**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
AVD247002016779

Bijlagen

2

Datum 19 december 2016
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 19 december 2016
Vervaldatum: 18 januari 2017
Factuurnummer: 16700779

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD247002016779	€ 935,00

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

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: donderdag 16 februari 2017 16:30
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: dossier AVD247002016779

Geachte heer [REDACTED]

Wij hebben van de DEC -RUG het advies over uw aanvraag ontvangen. Uit het DEC advies blijkt dat uw aanvraag is aangepast na correspondentie met de DEC.
Kunt u de aangepaste aanvraag aan ons toesturen?

Doordat de vergaderingen van de door u geselecteerde DEC en CCD in het geval van de behandeling van uw dossier niet goed op elkaar aansloten gaat de behandeltijd in totaal meer dan 40 werkdagen in beslag nemen. Ik zal u zo snel mogelijk na ontvangst van het aangepaste dossier op de hoogte stellen wanneer u een besluit kunt verwachten,

Vriendelijke groet, [REDACTED]

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl
.....
Bezuidenhoutseweg 73 2594 AC Den Haag
Postbus 20401 2500 EK Den Haag

.....
M [REDACTED]
E [REDACTED]

Afwezig op vrijdag in de oneven weken

-----Oorspronkelijk bericht-----
Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 19 december 2016 12:44
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: OntvangstBevestiging

Geachte heer [REDACTED]

Deze brieven zijn ook per post verzonden.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid www.ncadierproevenbeleid.nl
.....
Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag
.....



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.

Onze instelling verzorgt contractonderzoek om farmaceutische bedrijven en academische instellingen een passend inzicht te geven in de mogelijkheden van potentiële nieuwe geneesmiddelen. Met behulp van verschillende onderzoeksplatforms kunnen wij werkingsmechanisme, effectiviteit en biodistributie van nieuwe stoffen testen. Eerder hebben wij projecten aangevraagd voor meting van elektrische signalen in het centraal zenuwstelsel en perifere systemen en voor toepassing van de microdialyse techniek in het centraal zenuwstelsel. De huidige aanvraag is gericht op toepassing van de microdialyse techniek op perifere weefsels/organen.

In 2004 en 2007 heeft de FDA (Food and Drug Administration) rapporten uitgegeven waarin werd geanalyseerd wat de belangrijkste uitdagingen en oplossingen zijn bij de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen, met als doel het aantal succesvolle marktintroducties van nieuwe geneesmiddelen te verhogen. Het eerste rapport "Innovation and Stagnation: Challenge and Opportunities on the Critical Path to New Medical Products" identificeert het gebrek aan kennis over veiligheid en effectiviteit van nieuwe stoffen als een belangrijke uitdaging. In het tweede rapport "Critical Path Opportunities for Generic Drugs" wordt toepassing van perifere microdialyse in klinische studies benoemd als een specifieke tool voor deze uitdagingen. De techniek maakt het mogelijk de lokale vrije concentratie en activiteit van een test-stof te bepalen. Een belangrijk voordeel van de techniek is dat de plaatsing van de microdialyse sonde minimale weefselschade oplevert en dat meer monsters kunnen worden genomen dan bijvoorbeeld met het nemen van weefsel bipten. De methode en onze uitvoering ervan staat ook op dit moment nog volop in de belangstelling van de FDA. Zij hebben de wetenschappelijk directeur van ons bedrijf uitgenodigd om begin 2017 een lezing te komen geven over toepassingen en translationele waarde van microdialyse in preklinisch onderzoek.

Voordat een stof klinisch getest kan worden is het van belang dat de biologische beschikbaarheid bij een specifieke test dosering wordt bepaald in *in-vitro* en in *in-vivo* systemen. De *in-vitro* systemen geven een positieve indicatie van de werkzaamheid van een test stof. De *in-vivo* systemen geven informatie over de werkelijke biologische beschikbaarheid van de stof in een compleet organisme waarin ook metabolisme en excretie van de stof worden meegenomen. Tevens biedt *in-vivo* analyse een mogelijkheid om potentiële onbedoelde (off-target) negatieve effecten te identificeren.

Aanleiding voor dit project zijn onze uitgebreide ervaring met toepassing van de microdialyse techniek in onderzoek naar ziekten van het centraal zenuw stelsel en de vraag vanuit onze cliënten naar toepassing van deze techniek in perifere weefsels. In het verleden hebben wij methoden ontwikkeld voor microdialyse in vrijbewegende dieren in:

- het ileum,
- het cardiovasculair systeem,
- de medullae spinalis,
- longepitheel,
- de subcutis,
- het beenmerg van de tibia.

In de literatuur zijn ook methoden beschreven voor bemonstering van spier- en vetweefsel, lever, nieren, pancreas en tumor xeno-tranplantaten.

In het kort omvat het voorgestelde project de volgende onderdelen:

1. Gebruik van wild-type en/of (transgene-) ziektemodel dieren (ratten, muizen)
2. Het toedienen van test-stof(fen) via verschillende toedieningsroutes
3. Bepaling van de concentratie van de toegediende stof en/of ziekte-gerelateerde biomarkers in weefsels

De centrale techniek die zal worden toegepast in dit project is microdialyse. Deze techniek is gebaseerd op het gebruik van semi-permeabele membranen die met behulp van een kleine canule (~600 µm in doorsnede) in weefsel kunnen worden ingebracht. De canule wordt onder anesthesie geplaatst. Na herstel van het dier wordt de canule geperfundeed met een fysiologisch relevante oplossing zodat er over de membraan uitwisseling van stoffen uit de extracellulaire ruimte kan plaatsvinden. Het perfusaat wordt opgevangen en gebruikt om de concentratie van de test-stof en bio-markers te bepalen. Door toepassing van specifieke membranen, samenstelling van de doorloopvloeistof en de snelheid waarmee de vloeistof langs de membraan gaat, kunnen experimenten optimaal ingericht worden.

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?

Doelstelling van het huidige project is het vergaren van translationele kennis over ziekten, ziekteprocessen en vooral de biodistributie en farmacologie van potentiële nieuwe geneesmiddelen met behulp van microdialyse in perifere weefsels. Specifiek worden met behulp van microdialyse farmacokinetische (biologische beschikbaarheid) en farmacodynamische (effectiviteit) eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen bepaald. Deze informatie is essentieel om de onder andere door de FDA geïdentificeerde uitdagingen in de ontwikkeling van geneesmiddelen aan te pakken, zodat het aantal succesvolle marktintroducties kan worden verhoogd. Haalbaarheid van deze doelstelling is hoog, aangezien er gewerkt zal worden met gevalideerde en gestandaardiseerde protocollen.

3.3 Belang

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

De informatie verkregen in dit project levert een wetenschappelijke bijdrage door:

- het ophelderen van processen onderliggend aan ziektes
- identificatie en kwantificering van bio-markers voor diagnostische doeleinden

Vanuit maatschappelijk oogpunt is het project van belang voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen, waarbij op een snelle en kostenefficiënte manier antwoord wordt gegeven op door de FDA geïdentificeerde uitdagingen in het (pre-)klinisch onderzoek naar nieuwe geneesmiddelen. Het project levert een bijdrage door in een vroeg stadium in de ontwikkeling niet-werkzame stoffen, stoffen met ongewenste bijwerkingen/off-target effecten en stoffen die niet bij hun beoogde doel komen (door biologische barrières of metabolisering/uitscheiding) te identificeren en uit te sluiten, waardoor geen onnodige tijd en gelden worden besteed aan verdere ontwikkeling. Daarnaast levert het onderzoek zinvolle translationele informatie die van belang is bij het efficiënt uitvoeren van verder klinisch onderzoek.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Voor alle te testen stoffen wordt op basis van een heldere vraagstelling gedefinieerd hoe het individuele experiment wordt ingericht. De volgende kernvragen zijn hiervoor van belang:

- Welke diersoort is het meest geschikt voor het onderzoek: rat, muis of cavia?
- Eventueel toepassen van een ziekte specifiek (transgeen-) diermodel?
- Welke test-stof wordt via welke toedieningsroute gegeven?
- Welk beoogd doel-orgaan moet worden gemonitord, eventueel, in welk orgaan zou de test-stof afwezig moeten blijven?
- Bepaling van biologische beschikbaarheid en/of ook de effectiviteit van de test stof?

Op basis van antwoorden op bovengenoemde vragen wordt het betreffende proefdier volgens een passende SOP onder anesthesie gecanuleerd. Nadat het dier is bijgekomen en hersteld van de plaatsing van de canule wordt de canule aangesloten en geperfundeed met een fysiologisch relevante oplossing. Na het verzamelen van een aantal basale monsters kan de test-stof worden toegediend. In de monsters die worden verzameld na toediening kan de concentratie van endogene- en exogene stoffen worden bepaald.

Ter vergelijking en aanvulling van de data zullen soms ook weefsel monsters genomen (moeten) worden op specifieke tijdstippen. Microdialyse levert namelijk alleen informatie op over vrije extracellulaire stofconcentraties en niet van totale concentraties (dit is inclusief de intracellulaire en eiwit gebonden concentratie). De verhouding van vrije- en totale concentratie is een belangrijke parameter voor de biologische beschikbaarheid van test-stoffen. Het verzamelen van dergelijke monsters kan tot een

minimum worden beperkt door tijdstippen voor monstername te kiezen, zoveel mogelijk organen gelijktijdig uit te nemen en door organen uit te nemen aan het einde van het voorgaande microdialyse experiment.

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

Microdialyse in perifere weefsels:

Voor het uitvoeren van deze proeven wordt het dier onder passende anesthesie en analgesie gecanuleerd in de betreffende organen. De canule wordt onderhuids getunneld zodat de in- en uitgang zich bevindt op een lokatie waar het dier de canule niet zelf kan verwijderen of beschadigen. Nadat het dier voldoende is hersteld worden de canules aangesloten met dunne canules op een pomp die met een constante stroom van 0.1 tot enkele microliters per minuut de canule perfunderen. De perfusievloeistof is een fysiologisch relevante vloeistof, om effecten van de samenstelling van de vloeistof op het omringende weefsel te voorkomen.

Het perfusaat wordt opgevangen aan het uiteinde van de canule en wordt vervolgens geanalyseerd voor concentratie van de test-stof en/of een of meerdere bio-markers. Het opgevangen monstervolume is afhankelijk van de analytische bepaling(en) die moeten worden gedaan. Voor alle experimenten geldt dat eerst een aantal basale monsters moeten worden verzameld, waarna het dier een test-stof of *vehiculum* krijgt toegediend. Monsters kunnen opgevangen worden tot uren en zelfs dagen na toediening. Het dier heeft de mogelijkheid om tijdens het experiment vrij te bewegen en gedrag te vertonen.

Door microdialyse te combineren met het bemonsteren van bloed(producten) en/of CSF en/of post-mortem weefselafname is het mogelijk een voorspelling te doen van kinetiek van een test stof in de diverse bio-compartimenten (organen/weefsels). Dit is een zeer krachtige methode om werkingsmechanisme, effectiviteit, concentratie en bijwerkingen van potentiële nieuwe geneesmiddelen te bestuderen.

Verzamelen van weefsel monsters:

Deze methode is een alternatief of aanvulling voor microdialyse techniek en levert ook informatie over de verdeling van een test-stof en het effect van deze test-stof op bio-markers. Dieren krijgen de test stof toegediend en worden op specifieke tijdstippen getermineerd. Organen van de dieren worden uitgenomen en gehomogeniseerd. Het homogenaat wordt gecentrifugeerd en het supernatant wordt gebruikt voor de analyse van concentraties van de test stof of bio-markers. Deze methode heeft een aantal nadelen:

- Er zijn meer dieren nodig (n = 4-6 per tijdstip)
- De methode maakt geen onderscheid tussen gebonden en ongebonden (of tussen intra- en extracellulaire) concentraties
- Aanwezigheid van bloed in het orgaanweefsel kan de gemeten concentratie beïnvloeden

Voor bepaalde vraagstellingen kan het echter van groot belang zijn om toch een totale concentratie in weefsel te bepalen. Bijvoorbeeld wanneer deze informatie nodig is om vergelijkingen met eerdere experimenten te maken, of wanneer het niet mogelijk is om in microdialyse monsters de concentratie van de bio-marker te bepalen (bijvoorbeeld van eiwit-aggregaten). In een dergelijk geval is een goede afweging van de tijdstippen, toedieningen en dieraantallen van groot belang.

Concentraties van test-stof en/of bio-markers worden in alle verzamelde monsters uiteindelijk uitgevoerd met HPLC-MS/MS of ELISA bepalingen. Beide technieken zijn zeer gevoelig en maken het mogelijk om met relatief kleine monster volumes een uitspraak te doen over concentraties. Met de HPLC-MS/MS methodes is het vaak mogelijk om veel informatie uit één sample te verkrijgen, doordat verschillende stoffen uit hetzelfde monster geanalyseerd kunnen worden. Dit draagt bij aan een vermindering van het benodigde aantal proefdieren.

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.

Fasering:

- De potentiële nieuwe geneesmiddelen worden getest in een *in-vitro* setting op een passende interactie met de betrokken receptor (target engagement) en potentiële werkzaamheid (door cliënt)
- De stof is getest op toxicologische eigenschappen, waarbij vaak ook een eerste inschatting is gemaakt van de effectieve dosering in farmacodynamische en farmacokinetische experimenten.
- Op basis van bovengenoemde informatie en de vragen geformuleerd onder 3.4.1 wordt een

- experimenteel protocol opgezet voor de verdere bestudering van de stof.
- In het geval van een farmacokinetische studie wordt eerst in een *in-vitro* studie gecontroleerd of het met de beoogde opzet inderdaad mogelijk is om een meetbare concentratie van de test-stof in het perfusaat op te vangen
 - Het protocol wordt, na goedkeuring door de IvD (toetsing op: haalbaarheid, passend binnen de vergunning, 3V overwegingen en dierenwelzijn), uitgevoerd
 - Met de gegevens gewonnen uit de verzamelde monsters kan de cliënt het vervolg traject voor de test-stof bepalen. De IvD voert een post-hoc evaluatie van de experimenten uit

De samenhang van de verschillende proeven die worden uitgevoerd onder dit project bestaat (net als bij onze andere vergunningen) uit de toepassing van de centrale techniek voor de verzameling van de monsters: de microdialyse.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Perifere farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen.
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Brains-On-Line

De Mudden 16
9747 AW GRONINGEN



**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
AVD247002016779
Bijlagen
1

13 MRT 2017

Datum 10 maart 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer [REDACTED]

Op 5 december 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Perifere farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen." met aanvraagnummer AVD247002016779. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 16 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft op ons verzoek het projectvoorstel opnieuw ingediend omdat deze op basis van correspondentie met de DEC was aangepast.

Beslissing

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

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

U kunt met uw project "Perifere farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen." starten. De vergunning wordt afgegeven van 13 maart 2017 tot en met 31 januari 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie Rijksuniversiteit Groningen. Dit advies is opgesteld op 16 februari 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:
10 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD247002016779

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: Brains-On-Line
Adres: De Mudden 16
Postcode en plaats: 9747 AW GRONINGEN
Deelnemersnummer: 24700

deze projectvergunning voor het tijdvak 13 maart 2017 tot en met 31 januari 2022, voor het project "Perifere farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen." met aanvraagnummer AVD247002016779, volgens advies van Dierexperimentencommissie Rijksuniversiteit Groningen. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 5 december 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 16 februari 2017, ontvangen op 16 februari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 16 februari 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Perifere farmacokinetische en farmacodynamische eigenschappen van potentiële nieuwe geneesmiddelen				Het totaal aantal dieren is 2200. De verdeling tussen diersoort rat/muis is niet tevoren aan te geven.
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	2.200	85% Matig 15% Licht	
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	2.200	85% Matig 15% Licht	

Aanvraagnummer:

AVD247002016779

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.

Ieder jaar, uiterlijk 31 januari , ingaande vanaf de startdatum van de vergunning, koppelt de aanvrager aan de CCD terug welke soort teststof/geneesmiddel, welk type dierproef, en bijbehorend ongerief is uitgevoerd onder deze vergunning. Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken. Wanneer u overtuigend en onbetwistbaar kan aantonen dat er geen gegevens over de geteste stof kunnen worden vrijgegeven omdat de opdrachtgever deze als vertrouwelijke informatie heeft geclassificeerd kunt u deze informatie buiten de rapportage houden.

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

Voorschriften

De IvD controleert bij de beoordeling van de individuele werkprotocollen of de keuze voor het inzetten van een geslacht is besproken en onderbouwd door de klant.

Wanneer er sprake is van een pathologie model houdt de IvD specifiek toezicht of het eventuele ongerief voortkomend uit het ziektemodel niet veroorzaakt dat de ongeriefclassificatie matig wordt overschreden.



Aanvraagnummer:

AVD247002016779

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:

AVD247002016779

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 W17-08										
nr.	document NTS 2017808	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS oud			x						
3	Projectvoorstel oud				x			x		
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud				x			x		
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud				x			x		
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud				x			x		
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4 oud				x			x		
8	DEC-advies				x		x	x		
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
10	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
11	Reactie verzoek aanvulling 1				x		x	x		
12	Reactie verzoek aanvulling 2				x		x	x		
13	NTS aangepast	x								
14	Bijlage beschrijving dierproeven 1 nieuw				x			x		
15	Bijlage beschrijving dierproeven 2 nieuw				x			x		
16	Bijlage beschrijving dierproeven 3 nieuw				x			x		
17	Bijlage beschrijving dierproeven 4 nieuw				x			x		
18	Advies CCD		x							x
19	Beschikking en vergunning				x		x	x		



Aanvraag

Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10700 <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>Universiteit Maastricht</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>50169181</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	50169181									
Naam instelling of organisatie	Universiteit Maastricht																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																
KvK-nummer	50169181																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Minderbroedersberg</td><td>4-6</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>616</td><td></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6200 MD Maastricht</td><td></td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL04 INGB 0679 5101 68</td><td></td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Universiteit Maastricht</td><td></td></tr></table>	Straat en huisnummer	Minderbroedersberg	4-6	Postbus	616		Postcode en plaats	6200 MD Maastricht		IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht	
Straat en huisnummer	Minderbroedersberg	4-6															
Postbus	616																
Postcode en plaats	6200 MD Maastricht																
IBAN	NL04 INGB 0679 5101 68																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Maastricht																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Associate Professor</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	Associate Professor		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	Associate Professor																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>PhD Student</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	PhD Student		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]	
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.															
Functie	PhD Student																
Afdeling	[REDACTED]																
Telefoonnummer	[REDACTED]																
E-mailadres	[REDACTED]																

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 01 - 02- 2017
- Einddatum 01 - 02- 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Autoimmunity of the nervous system
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Autoimmunititeit van het zenuwstelsel
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC-UM
- Postadres Postbus 616() 6200 MD Maastricht
- E-mailadres

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1584 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	[Redacted]
Functie	[Redacted]
Plaats	Maastricht
Datum	2 - 1 - 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 | Autoimmunitet van het zenuwstelsel |
| 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Autoimmunitet, zenuwstelsel, myastenia gravis, immunisatie, immuun-therapie |

2 Categorie van het project

- | | |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project.

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

3 Projectbeschrijving

- | | |
|---|--|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | Recent is bewijs gevonden dat auto-immuun antistoffen ook syndromen van het centraal zenuwstelsel kunnen veroorzaken zoals schizofrenie. Hierbij kunnen auto-antilichamen bijvoorbeeld niet alleen spieren of gewrichten aantasten, maar ook neurologische en neuropsychiatrische symptomen veroorzaken. De ziektemechanismen van auto-antilichamen in het zenuwstelsel zijn echter nog niet goed bekend. Dit project zal deze auto-antilichamen van het zenuwstelsel karakteriseren in patiënten, nieuwe doelwitten identificeren en nieuwe behandelingen voor deze patiënten testen. |
|---|--|

- | | |
|---|--|
| 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | <p>Patiënten met neurologische of psychiatrische aandoeningen zullen door betere identificatie van deze antilichamen beter behandeld kunnen worden. Verder verwachten we dat door identificatie van nog onbekende auto-antilichamen meer kennis over auto-immuun ziekten verkregen wordt hetgeen een adequate behandeling ten goede komt. Voor sommige auto-immuunziekten zijn er nu zelfs helemaal geen behandelingen beschikbaar. Concreet worden in dit project nieuwe diagnostische testmethodes als basis voor nieuwe therapieën ontwikkeld.</p> |
| 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | <p>Voor dit project zullen muizen, ratten en konijnen gebruikt worden. Wij schatten maximaal 5128 dieren, waarvan 3294 ratten, 1744 muizen, en 90 konijnen nodig te hebben over een periode van 5 jaar.</p> <p>g</p> |
| 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | <p>De dieren kunnen bijwerkingen krijgen van de te testen medicatie en hiervan stress ondervinden; de chirurgische ingrepen kunnen eveneens stress veroorzaken. Daarnaast zullen de dieren ongerief ondervinden van de immunisatieprocedure alsmede van de symptomen/effecten van auto-immuunziekten. Ook van de gebruikte gedragstesten zullen de dieren ongerief ondervinden.</p> |
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | <p><u>Zoals beschreven in de bijlagen ondervinden alle dieren ongerief van mild tot matig, dit door gedrags, neurologische en bewegingstesten, de immunisatie met Complete Freud's Adjuvant (appendix 2) en het doorsnijden van de zenuw aan een poot zorgt voor matig ongerief. Omdat de stoornis gedurende de tijd ontwikkelt kan het, eventuele, ernstige ongerief vroegtijdig geobserveerd worden. Wanneer het ongerief vordert naar ernstig zullen de dieren de humane eindpunten bereiken en opgeofferd worden. Hierdoor zullen de dieren geen ernstig ongerief ondervinden.</u></p> |
| 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop? | <p>Na afloop van het project zullen de dieren worden geëuthanaseerd waarna het weefsel wordt geanalyseerd.</p> |

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. | <p>Er zijn nog geen alternatieve modellen beschikbaar die complex genoeg zijn om de interactie tussen alle factoren (o.a. zenuwstelsel en immuunsysteem) te bestuderen. Daarnaast is het nodig om klinische effecten aan te tonen en de bijwerkingen te bestuderen, voordat een nieuw medicijn toegepast kan worden op de mens. Indien er alternatieve methodes beschikbaar zijn (zoals hybridoma cellijnen of expressievector) voor de productie van antistoffen zullen wij hiervan gebruik maken.</p> |
|--|---|

4.2 **Vermindering**

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

Statistische methodes worden toegepast om zo weinig mogelijk dieren te gebruiken. Tussentijdse analyses worden uitgevoerd om het aantal proefdieren zo klein mogelijk te houden. Go/no-go momenten zijn op verschillende momenten ingepland voor het vermijden van onnodige experimenten.

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 diermodellen voor myasthenia gravis, een autoimmuun ziekte waarbij auto-antilichamen receptoren aanvallen in de neuromusculaire junctie met voornaamste resultaat een verzwakt en vermoeid ziektebeeld, zijn goed gevalideerd als auto-immuun ziektemodel en voor het testen van medicijnen voor deze ziekte. De onderzoekers hebben veel ervaring in het werken met dit model en de gebruikte methodes. Andere diermodellen zullen nieuw ontwikkeld worden. Afhankelijk van verwachte symptomen/phenotype/parameters zullen wij de meest geschikte diersoort/species kiezen. Konijnen worden alleen gebruikt voor het opwekken van antilichamen. Dit diermodel is het meest gebruikt omdat het immuunsysteem van konijnen voordelen heeft ten opzichte van dat van knaagdieren. De immuunreactie geeft een breder spectrum en meer specifieke antistoffen.

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

Er wordt pijnstilling en anesthesie gebruikt om ongerief te verminderen. Indien dieren meer ongerief vertonen dan verwacht, wordt het experiment voortijdig beëindigd.

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.

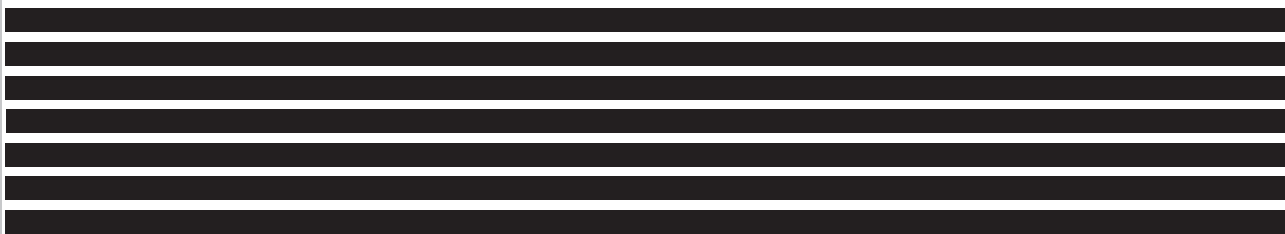
- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is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

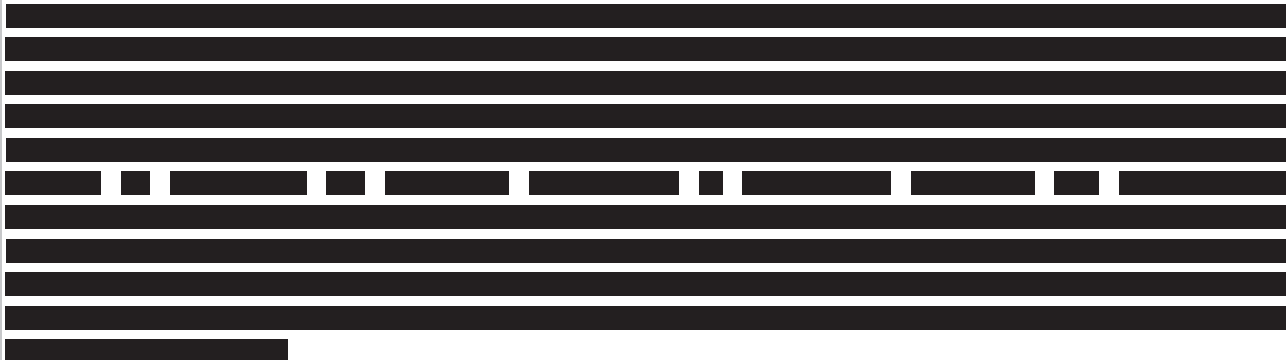
Autoimmune diseases are caused from the over activity of the immune system against molecules and tissues normally present in the body. In autoimmune diseases, the immune system and genetic and environmental factors play all an important role in the pathologies. There are several hypotheses that try

to explain the origin of autoimmunity. Clonal anergy, idotype network, clonal ignorance, suppressor population and clonal deletion are more prominent.

Autoimmunity affects 7-9 % of the general population (Cooper et al., 2009) and its clinical spectrum varies from organ specific to systemic diseases. A large number of diseases have been discovered targeting the nervous system inducing a wide variety of syndromes ranging from musculoskeletal to neurological, and neuropsychiatric. Targets/antigens of the nervous system are mostly voltage gated ion channels, ligand gated receptors or proteins associated to these membrane antigens. It is not surprising that an antibody response to this kind of targets has far reaching effects on the functioning of the neurons (██████████ et al, 2013). Autoimmune neuromuscular channelopathies (primarily Myasthenia gravis (MG); one of most well-known autoimmune disorders, where the autoantibodies target molecules presents in the neuromuscular junction, such as acetylcholine receptor, resulting in a weakness and fatigability clinical symptomatology. There are many animal models that reproduce the human disorder by active or passive immunization and which have been used to describe the targets, study the pathogenic mechanisms and define the efficiency of new therapies to treat the disease) have been well studied and are exemplary for the study of pathological mechanisms of autoantibodies in the peripheral (PNS) and central nervous system (CNS). Complement deposition and inflammation, modulation of the receptor function, antigen internalization and loss or block of the receptor associated proteins are the pathogenic mechanisms described in many nervous system autoimmune disorders. However, the pathways underlying more recently identified disorders still remain unknown. Increasing the knowledge in this area will help the clinicians to understand the pathologies and test and provide more efficient treatments to the patients, who in some cases don't have the chance to be treated yet.

Recently, pertinent evidence has been published suggesting an important role for auto-antibodies in a number of CNS syndromes. The cerebrospinal fluid (CSF) always contains antibodies present in the periphery (Poduslo et al, 1994). There is a large body of evidence that auto-antibodies (e.g. in autoimmune channelopathies) reach sites in the CNS and have immunopathogenic effects (Diamond et al, 2009; ██████████ et al, 2013) in spite of the protection posed by the blood-brain-barrier (BBB). At the same time intrathecal antibody production, meaning the presence of antibody producing B-cells in the CNS, was detected in patients with N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis (Martinez-Hernandez et al, 2013; Endres et al, 2015). Since 2005, every year 1 or 2 novel antigens of CNS and their associated syndromes were discovered (Leypoldt et al, 2014). The methodology for the detection of these autoantibodies is based on diagnostic assays using rat antigenic tissue. Most neuronal ion-channels and receptors fulfil essential functions and are highly conserved between species. These findings changed important paradigms within autoimmunity and also neuropsychiatric diseases and still the pathogenic mechanism of many of the recently discovered autoantibodies are not well understood. Noticeably, all these disorders targeting membrane proteins react well to immunosuppressive therapy. Of special attention to us is also the role of these autoantibodies in neuropsychiatric disorders. The pathological mechanisms of disorders such as schizophrenia and bipolar disorder are poorly understood, but likely this diagnosis is a wide collection of patients with different pathological mechanisms. The hypothesis of antibody mediated autoimmunity as cause in schizophrenia has gained increasing attention as it was supported by several findings (Pandarakalam, JP., 2013; ██████████ P. et al., 2015; ██████████, C. et al., 2016): (a) comorbidity of neuropsychiatric diseases and autoimmune diseases, (b) susceptibility genes increasing risk for neuropsychiatric disorders are involved in immune regulation, (c) cytokine dysregulation, (d) association with infectious diseases and (e) responsiveness to immunosuppressive therapy.





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 project focuses on 3 main aims (Figure 1):

1. Generation of antigenic and antibody sources (see appendix 1): they can be used for the induction of the animal model and/or the assessment of the development and progression of the animal model. It is important to mention that the proteins obtained from this point will also be used for the screening of the presence of autoantibodies, in patients with disorders related with the nervous system and with a potential autoimmune disorder origin.

To this end, we will use animals to produce antigen rich tissue from adult animals and embryonic cells of interest (mostly primary neuronal cells) (appendix 1-1) which can then be used to test reactivity of human blood or CSF to these tissues. This is possible, since neuronal receptors and ion-channels have a high inter-species homology (Lancaster E., et al., 2010, Meizan L, et al., 2009). We will use rats for brain extraction, female pregnant rats for embryonic primary cell cultures (appendix 1-1) and male rats to obtain AChR after transection (Rochkind S. and Shainberg A., 2013) (appendix 1-3).

Additionally, immunization of animals with the antigen of interest will be included under this purpose since the antibodies (appendix 1-2) generated will be used for the induction of a passive transfer autoimmune animal model and/or to assess the development and the progression of the animal models. Only antibodies that are not commercially available or cannot be generated without the use of animals will be generated under this license. We will use rabbits to generate polyclonal antibodies and mice, to generate monoclonal antibodies. In both cases, there is a preference on female, since they are reported to be group housed more successfully than males because females are more docile and less aggressive in social interaction (Hendriksen and Hau, 2003).

2. Generation of nervous system autoimmune animal models (see appendix 2 and 3): by active and passive immunization to develop known and new models and to characterize the pathogenicity, effector mechanisms and spectrum of symptoms of antibodies targeting the nervous system. The antigens or antibody molecules to induce the model are not all derived from this project proposal, since sometimes they can be obtained recombinantly, like the antibodies cloned from a patient or obtained from a company, like the AChR from *Torpedo californica*).

To answer this question, we will perform active or passive immunization in rodents (rats and mice) to develop models of autoimmune diseases of the nervous system and study their behavioural and pathological phenotypes and the mechanisms used by the antibodies against an

specific target to generate the disease.

The use of knock-out (KO) animal models will not answer the question of the antibodies role in neurologic and/or psychiatric disorders, either the description of their pathological mechanisms, since the KO approach will only cover the blocking of the target protein, but it is known that autoantibodies can have other mechanisms of action like, activation, internalization, activation of the complement, etc.

The selection of the gender will depend on the available literature and the standardized guidelines available for each model. For example, the active immunization model for myasthenia gravis or EAMG is standardized by using Lewis female rats. However, there are other models where the gender is not robustly established. An example of it is that, in the literature we have found described no differences between male and female mice in some of the strains, such as C57Bl6, one of the most common strains used in experiments related with our research (Papenfuss T. L., et al., Journal of Neuroimmunology, 2004). This data is in correlation with some studies where mice have been injected with patient autoantibodies, where in some cases males were chosen (Hammer c. Et al., Molecular Psychiatry, 2014; Planaguma J. Et al., Brain, 2015) as female (Castillo-Gomez R. Et al., Annals of Neurology, 2016). Because of this, we would like to keep open the decision on the mice gender, since we will adapt it to the most recent literature before starting the experiment (see project proposal, section 3.2, second aim).

The procedure is similar to aim 1 (generation of antibodies by active immunization) with the difference that animals will develop the full-blown pathology, since the exposition time to the antigen is longer than when animal models are developed. Additionally, the strain and species used in antibody production can differ to those used for autoimmune animal models and therefore react differently to the immunization.

We are interested in neuropsychiatric disorders with an autoimmune origin. We have based the selection of our antibodies and its pathogenic target or antigens and the correspondent animal models in the literature. Since the NMDAr has been described as a cause of autoimmune encephalitis, many other neuronal receptors have been identified to be the target of autoantibodies in other patients causing similar phenotypes. This means that other antigens and its autoantibodies will be included in case of newly discovered as a cause of an autoimmune neuropsychiatric disorder.

3. New therapies efficacy studies in nervous system autoimmune animal models (see appendix 4): new and repurposed drugs will be assessed using relevant models previously generated in aim 2 (rats and mice) to characterize autoimmune treatments and asses their side effects.

These 3 goals can be met in a period of 5 years, because we can start at aim 1, 2 and 3 simultaneously for different antigens currently in different research stages. The best characterized disease of MG can directly be used to study drug effectiveness and side-effects, whereas NMDAr encephalitis has been characterized in preliminary mouse models (Planagumà, J. et al., 2014; Hammer, C. et al., 2013) and will thus be further characterized according to aim (2) and then (3).

[REDACTED]

3.3 Relevance

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

By screening populations of neurologic and psychiatric disorders for the presence of autoantibodies on diagnostic assays developed from animal tissue, we aim to identify a subgroup of patients with an autoimmune origin of their symptoms. Analysis of autoantibodies will provide a proof of concept in case the disease symptoms are caused by a specific targeted autoimmune condition and decipher the pathogenic mechanisms behind the condition. This will give insight into which neurotransmitter signalling/ neuronal pathways and/or cell types are affected in disease and thereby provide a better understanding of the disease mechanisms. This will directly reveal therapeutic targets in the concrete autoimmune condition but can also bring to light some general knowledge on which neuronal pathways are affected in disorders like schizophrenia. Then, new or repurposed drugs can be used as alternative therapies for these pathologies which are more efficient and induce less aggressive/less side effects. For example, specifically in myasthenia gravis, some patients who do not improve by using the current available treatments will benefit from the study of new therapies targeting other pathways.

Clinicians will be able to diagnose and treat patients in a more efficient manner. This would be of strong impact on a subgroup of patients since many patients with neuropsychiatric disorders are diagnosed early in their life and will be strongly impaired chronically. A targeted treatment would have a great impact for these patients and disburden the psychiatric hospitals and institutions.

3.4 Research strategy

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

We will describe in the following section the different strategies to reach the 3 main research goals:

1. Production of antigenic and antibodies molecules for the generation and/or characterization of the development and progression of known or new nervous system autoimmune animals models and screening and identification of novel autoantibodies targeting molecules in the nervous system in human diseases.

- a) Adult rat tissue isolation: brains will be isolated to perform an immunohistochemistry (IHC) analysis for the detection of autoimmunity in patients with autoimmune disorders affecting the nervous system. We will use material from neurologic and psychiatric sick patients coming from in house samples, samples from other hospitals or from new studies already approved by the ethical committee. Also, the tissue will be used as a tool to identify novel antigens through an immunoprecipitation technique. Muscles from denervated rats will be also used to isolate AChR which will be used to describe the development and progression of the animal model pathology using techniques like ELISA or radioimmunoassay (RIA) to identify autoantibody levels in animal models and patient's material.

- b) [Redacted text]

- c) [Redacted text]

[REDACTED]

2. Autoimmune animal model generation targeting neuronal surface proteins or molecules expressed in the NMJ, using active or passive immunization strategies. Novel and known models will be induced and characterized by studying the spectrum of symptoms generated by the antibody action in each case.

Rodents will be actively or passively immunized to develop models of autoimmune diseases of the nervous system and study their behavioral, neurological and locomotion characteristics and the pathology. The up/downregulation or expression of specific genes/proteins involved in the nervous system will be used to study the role of these proteins in naïve animal and animal models where nervous system pathology is induced to describe the specific role of those proteins in these disorders.

3. Drug efficacy and side effects in nervous system animal models.

[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.

[REDACTED]

A further description of the procedures performed in each level is explained:

1. Production of antigenic tissue and antibody molecules for the generation and/or characterization of nervous system autoimmune animal models and study of novel autoantibodies targeting the nervous system in human diseases.

In appendix 1 we describe the creation of antigenic tissue and antibodies for different purposes

including the generation of primary cell cultures, material used for screening (AChR for RIA and brain for IHC), or the antibodies required to generate passive transfer models. Within this appendix, no animal will undergo any procedure as behavioural, neurological or locomotion tests. It will be animals of different ages (embryonic to adult) which will be sacrificed for isolation of tissue containing the antigen of interest. The mothers will be sacrificed and their tissue will also be used to store antigen containing tissues (mainly the brain) and embryos will be isolated for primary cell culture (Appendix 1). For the generation of AChR the tissue will be enriched by performing a sciatic nerve transection and letting the animals recover which will increase the number of synapses (sprouting) and thereby the density of AChR in the tissue (Appendix 1). The generation of antibodies in vivo in rodents will be also performed under this aim since the antibodies obtained from the active immunization of rodents can in turn be used for the development of autoimmune animal models generated by passive transfer and/or the characterization and screening of autoantibody levels in animal models and patient's material.

2. Development and characterization of novel or known nervous system autoimmune disorders.

Rodents will be immunized actively (with antigen) (Appendix 2) or passively (with autoantibodies) (Appendix 3) which will induce an autoimmune diseases targeting neuronal surface antigens or molecules expressed in the NMJ. Depending on the antigen, we expect different symptoms which we will measure with a defined set of behavioural, neurologic and locomotion tests. In the end of the experiments animals will be sacrificed and tissues collected for analysis of pathogenic mechanisms.

3. Efficacy and side effects study of new or repurposed drugs to treat autoimmune diseases of the nervous system.

In appendix 4 we describe the procedures for testing treatments in the animal models described before. The animals will thus perform similar behavioural, neurological and locomotion examinations as in appendix 2 and 3, but will be treated with new and/or repurposed drugs with special focus on drugs targeting the immune system or protecting the target organ (i.e. targeting plasma cell: proteasome inhibitors (██████, ████. et al., 2010, and protein silencing; ████████████████████ et al., 2009, ██████████ et al., 2016). Again, the animals will be sacrificed in the end of all procedures and their tissue analysed for signs of inflammation etc.

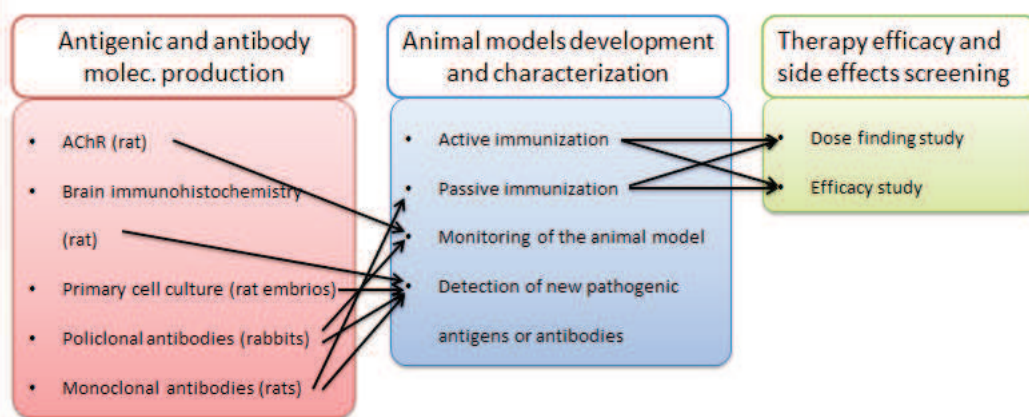


Figure 1. Correlation between the outcomes of each aim proposed in this protocol.

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 different components of the described project are largely interlinked with the common objective to describe and treat nervous system disorders of autoimmune origin. Well known and novel antigens of the CNS or the PNS and antibodies targeting these antigens relevant to human disorders will be produced (appendix 1) and used to generate animal models (appendix 2 and 3) which will be used to test efficient treatments and its side effects (appendix 4). Novel pathogenic antibodies will be identified using antigenic sources generated in appendix 1. Antigens and antibodies will be used to generate and characterize the development and progression of the disorder in the animal models. The animal models will be characterized in detail for those antigens/antibodies that have not been described previously. The animals will be injected with the antigen (active immunization) or with the autoantibodies that causes the disease (passive immunization) available in house, in some cases the antibodies will be obtained from recombinant patient autoantibodies expressed in cells for example or the antigens from another source like the electric organ of the *Torpedo californica* in case of the AChR. Animal models will be characterized *in vivo*, using behaviour, neurologic and locomotor tasks and also in an *in vitro* level, to ensure the progression of the pathology through the alteration of the immune system markers and to describe the pathological mechanisms underlying each disorder. Later on, once the model is robustly established, potential therapies to treat the diseases will be screened using these animal models. The drugs tested will vary from standard, repurpose to novel.

Following the flow chart from Figure 2 those are the go/no go criteria for the study in general, more specific criteria will be specified in the specific appendix concerning the question.

- a) Pathogenic molecules source available: go criteria to the production of the antigenic and antibody molecules in case of no quality available material from an external source (no -go criteria).
- b) Quality and quantity: the material obtained from the generation of antigenic molecules will be tested for quality and quantity, in case it will not follow the requirements a no go criteria for the next step will be applied and a new antigenic molecule will be generated changing some variables in the experiments (e.g. species, gender, route of administration, frequency, dose, adjuvants, etc.). Once the antigenic product gave the results expected in terms of quality and quantity, a go

criteria will be followed to generate autoimmune animal models. An example of quality is the immunogenic capacity of the antigen, the conformation, the affinity and other parameters that will be tested in vitro. The amount required for each purpose varies.

- c) Robust and standard: the capacity to reproduce the animal model and the mimicry with the human disorder will be taken into account. A no go criteria will be determined by a not strong enough difference between the animal model and its control or because of non-reproducible data between the different experiments. Since the animal models concerning CNS and autoimmunity are not still well establish by anyone, we don't know which phenotype we can expect. Because of this, we will follow the procedures performed by well-known laboratories which already performed similar experiments to characterize in the past other autoantibodies and their targets. If no differences are observed between the model and its control, we will modify some parameters (concentration, administration via, frequency, etc.) to see whether the effect of the antigen/ antibodies can be shown. When the model shows a robust phenotype and pathogenic mechanisms are observed, a go criteria for the next step, therapy efficacy and side effects screening, will be followed. An example of standardization and reproducibility is the presence of autoimmunity in the animal model (minimal significant difference of 10% between the groups in behaviour, neurological and locomotion tasks and detectable levels of immunoglobulins, complement system molecules, cytokines or other inflammatory markers and the capacity to reproduce these changes in different experiments following the same procedures.

After this point one of the main objectives is reached: the generation and characterization of a novel nervous system autoimmune animal model.

- d) Efficient and safe: the success of a new therapy in an animal model will be described and also the side effects. The experiment will proceed if the animals develop autoimmunity as described in c. A no-go criteria will be considered in case the therapy did not show any improvement in the animal model compared with the control. Next the dose and/or the route of administration will be modified. In case the side effects are tolerable, considering the specific human endpoints (>20% weight loss, severe acute inflammation at the immunization point and self-induced trauma), we will have a go criterion. If an improvement is observed, with a reduction of the disease phenotype and the reduction of pathogenicity a go criteria will be followed using this drug in other autoimmune model.

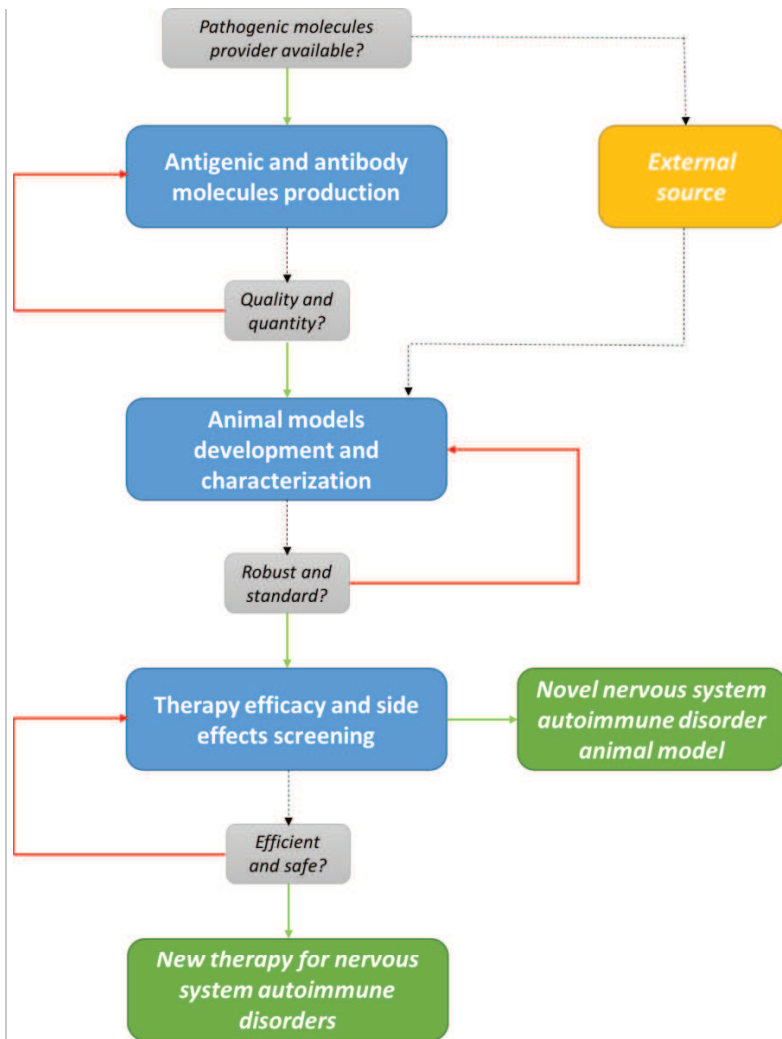


Figure 2. Go and no-go criteria flow chart for the study. The criteria to take into account are expressed in the grey boxes, the main steps of the study are contained in the blue boxes and the objectives showed in green boxes. Green arrows became a go criteria while red arrows mean no-go criteria.

References:

Aspelund A, Antila S, Proulx ST, Karlsen TV, Karaman S, Detmar M, et al. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *The Journal of experimental medicine*. 2015 Jun 29; 212(7):991-9.

Cooper GS, Bynum ML, Somers EC. Recent insights in the epidemiology of autoimmune diseases: improved prevalence estimates and understanding of clustering of diseases. *J Autoimmun*. 2009 Nov-Dec; 33(3-4):197-207.

_____, T, Dersch R, Stich O, et al. Immunological findings in psychotic syndromes: a tertiary care hospital's CSF sample of 180 patients. *Frontiers in human neuroscience*. 2015; 9: 476.

Hammer, C.; Stepniak, B.; Schneider, A.; Papiol, S.; Tantra, M.; Begemann, M.; Siren, A.L.; Pardo, L.A.; Sperling, S.; Mohd Jofrry, S.; et al. Neuropsychiatric disease relevance of circulating anti-NMDA receptor autoantibodies depends on blood-brain barrier integrity. *Mol. Psychiatry* 2014, 19, 1143-1149.

Lancaster E, Lai M, Peng X, Hughes E, Constantinescu R, Raizer J, Friedman D, Skeen MB, Grisold W, Kimura A, Ohta K, Iizuka T, Guzman M, Graus F, Moss SJ, Balice-Gordon R, Dalmau J. Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *Lancet Neurol.* 2010 Jan; 9(1):67-76. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70324-2

Leypoldt, F.; Armangue, T.; Dalmau, J. Autoimmune encephalopathies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2015, 1338, 94–114.

Martinez-Hernandez E, Horvath J, Shiloh-Malawsky Y, Sangha N, Martinez-Lage M, Dalmau J. Analysis of complement and plasma cells in the brain of patients with anti-NMDAR encephalitis. *Neurology.* 2011 Aug 9;77(6):589-93

Meizan Lai, Ethan G. Hughes, Xiaoyu Peng, Lei Zhou, Amy J. Gleichman, Huidy Shu MD, Sabrina Matà, Daniel Kremens, Roberta Vitaliani, Michael D. Geschwind, Luis Bataller, Robert G. Kalb, Rebecca Davis, Francesc Graus, David R. Lynch, Rita Balice-Gordon, Josep Dalmau. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Annals of Neurology.* 2009 Apr; 65, (4): 424–434. doi 10.1002/ana.21589

Poduslo JF, Curran GL, Berg CT. Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1994 Jun 7;91(12):5705-9.

Pandarakalam JP. Is autoimmunity involved in the aetiology of schizophrenia? *Progress in Neurology and Psychiatry,* 2013; 17(1), 24–28.

Planaguma, J.; Leypoldt, F.; Mannara, F.; Gutierrez-Cuesta, J.; Martin-Garcia, E.; Aguilar, E.; Titulaer, M.J.; Petit-Pedrol, M.; Jain, A.; Balice-Gordon, R.; et al. Human N-methyl-d-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain J. Neurol.* 2015, 138, 94–109.

Rochkind S. and Shainberg A. Protective Effect of Laser Phototherapy on Acetylcholine Receptors and Creatine Kinase Activity in Denervated Muscle. *Photomedicine and Laser Surgery.* October 2013, 31(10): 499-504. doi:10.1089/pho.2013.3537.

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	Generation of antigenic and antibody sources (1. Brain tissue insolation)
2	Generation of antigenic and antibody sources (2. Antibody generation)
3	Generation of antigenic and antibody sources (3. Acetilcholine receptor extraction)
4	Active immunization in rodents
5	Passive immunization in rodents
6	Therapy efficacy and side effect in nervous system autoimmune models
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'.
- 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 | Generation of antigenic and antibody sources |

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 creation and isolation of antigen and antibody rich material using animals to generate and follow the progression of the animal models and the drug screening on them. The same material will be used to identify novel pathogenic antigens in patient's material, which is a positive feedback process to generate novel animal models to describe the pathogenic mechanisms underlying the disease and try therapeutic approaches to treat them. This will include (1) the production of primary cell cultures of neurons, astrocytes and microglia, (2) isolation of tissue of expected location of antigen, which is brain, peripheral nerves and muscle tissue and (3) generation of antibodies by immunization to use them on the development of passive models.

The primary outcome of this section is based, on one hand, on the generation of diagnostic assays to improve the detection of antibody mediated autoimmunity in central nervous system (CNS), generating rat embryonic primary neuronal cell lines and rat adult brain slices for fluorescent or normal staining, two techniques already well established as a diagnostic method in patients with neurologic and psychiatric impairment. Neuronal antigens are expressed in high densities in the brain when compare with other tissues in the body and have a high interspecies homology (Table 1), so all known autoantibodies causing CNS diseases in humans cross-react with the rat antigen (Lancaster E., et al., 2010, Meizan L, et al., 2009). For this purpose, pregnant female rats and the embryos/pups will be recovered by caesarean section between day 18 and birth. The mother will be sacrificed in any case and the brain isolated for use as described above.

On the other hand, the generation of acetylcholine receptor (AChR) is included in this project using a denervation technique, where big amounts of the antigens will be generated and then isolated (Rochkind S. and Shainberg A., 2013). The protein obtained can be used to perform assays where antibodies from patients or other animal models can be analysed and to generate the active immunization models for AChR (Appendix 2).

For the generation of *in vivo* antibodies, we will follow the code of practice for the immunization of laboratory animals. Weekly injections of the antigen of interest are performed, (*s.c.*) to the animal until the immunoglobulin levels reach the peak of expression, around 2-6 weeks after the first injection. The best time point will be determined by testing IgG levels in the blood of the animals (obtained from saphenous vein, every 3-10 days maximum, following the NC3R guidelines for blood sampling).

The use of strong adjuvants (like Complete Freund's Adjuvant, CFA) is required to break tolerance to self-antigens (autoimmunity models by active immunization, see appendix 2). However, for general antibody production (as required here), the use of alternative adjuvants (like incomplete Freund's adjuvant, IFA) will be enough since for this purpose autoimmune reaction is not required. Later on, the animal will be sacrificed and material (e.g. serum and/or splenocytes) will be used for the induction of a passive transfer autoimmune animal model (see appendix 3) and/or to assess the development and the progression of the animal models (see appendix 2 and 3).

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

For the neuronal primary cell cultures the animals will be sacrificed (by decapitation) between embryonic day 18 (retrieved from the uterine horn) and just after birth to create primary cell lines of different cell phenotype. The age depends on the antigen of interest and the expression profile during the certain age. The cells will be used for a diagnostic test to analyse whether autoantibodies against brain antigens are present in serum or cerebrospinal fluid (CSF) of patients with potential central nervous system (CNS) autoimmunity or autoimmune rodent models. Additionally, these cells will be used for *in vitro* assays to study the pathogenic effect of patient autoantibodies on neuronal cells, e.g. internalization of antigen and alteration in ion channel function. Primary cell culture will preferentially be obtained from the unused pups coming from the breeding of the other animal procedures described in this proposal. We are currently working on the setting up of the embryonic cell culture assay, using 1 day born animals, since some groups in the university are regularly working with these animals and we could take the brain as a surplus material.

Rats will be sacrificed to isolate the brain and tissue from other organs (e.g. liver, spleen, etc.) to use as control. The tissue is used for immunohistochemistry (IHC) with patient's IgG in serum or CSF as primary antibody and immunoprecipitation of human autoantibodies. This method is common for the detection of autoantibodies against neuronal antigens in patients, since the homology between the human and the rat proteins is higher than 92% (Lancaster E. 2010; Meizan L. et al., 2009) (Table 1). It is preferred over the use of human post mortem material for different reasons: (a) The antigens are spread over the whole brain, so the complete brain has to be used for the method, but usually a limited amount of serum/CSF is available to do the staining, which leads to practical difficulties on human brain tissue. (b) The fixation and freezing of the tissue has to be done in a very consistent way to guarantee trustful, replicable diagnostic assays; human tissue is commonly fixed with formaldehyde or freshly frozen, which is not the optimal preparation of the tissue for our purpose. (c) Additionally, the post mortem delay significantly affects the sensitive antigens and introduces variability that that might lead to misdiagnosis (false positive or false negative) of autoantibody presence. The animals used for this purpose will mostly be the mothers of the embryos used for creation of primary cell cultures. Yet, during times in which no experiments with embryos are necessary, females from breeding, and males will be also used for the

purpose of brain isolation. In case no embryos are required at this period and a denervation experiment is ongoing, brain from the denervated males will be also used for this purpose since no gender differences have been identified. It is important to mention that when no primary cell cultures are necessary, brains from rats euthanized in experiments from other researchers at the university will be used in case they are available.

Table 1. [REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

For the antigen enriched tissue generation of AChR generation, male rats will have a sciatic nerve transection in one of the hind legs. We will use 9 week old (275g) male rats, since those specimens are bigger and the amount of muscle is more abundant due to hormonal differences. In female rats the effect of estrogen on the nervous system would induce a variation that would request higher number of animals per group. Animals will undergo a partial sciatic nerve transection under complete anesthesia in one of the hind legs (unilateral) to reduce the discomfort. Peri and post-operative analgesia will be applied for min 3 days post-operative, prolongation on indication. After the intervention, the nerve will start recovering by sprouting and new neuromuscular junctions will be created, with a higher expression of AChR (Rochkind S. and Shainberg A., 2013). Two weeks later, animals will be brought under anaesthesia and sacrificed. Afterwards, the receptor derived from rats will be isolated and used in multiple experiments in appendixes 1, 2 and 3. The active immunization models for AChR-MG (immunized using *Torpedo californica* AChR (tAChR)) results in an antibody production targeting not only the tAChR, but also the rat AChR. The amount of antibodies in the serum is a good indicator for the severity of disease in these animals. However, in order to be able to measure the concentration of antibodies against the AChR in the serum of rodents, a radioimmuno assay (RIA) needs to be carried out, wherein the rodent AChR is a necessary reagent. To this end, the animals of this appendix will be euthanized and the carcasses will be then used to extract the antigen.

The methods are operational for some antigens e.g. AChR. For those neuronal antigens that are yet to be identified, the protocol might have to be changed, e.g. the animal might need to be perfused for optimal preparation of the tissue.

For the generation of antibodies in animals, rabbits and rodents will be immunized with the antigen of interest. Animals will be tested for raising immunoglobulin levels in serum to determine the number of antigen injections and to sacrifice the animals at the highest peak of antibody levels. Animals will not follow any other kind of tasks and control animals are not required for this purpose. If any of the animals develop a phenotype, as a result of the immunization, the standard humane endpoints (section J) will be applied. For this purpose, the preservation or the homology between the proteins in human and rabbit/rodent is not necessary, since the animal will only develop antibodies against the antigen injected, and we will determine the animal species in advance based on our specific interest. The antibodies

generated, in this case polyclonal antibodies, will be used to label the organs where the antigens are expressed, to see, for example, if the injection of autoantibodies reduces the density of that specific protein. On the other hand, monoclonal antibodies can be used for the purpose mentioned before but also to generate passive transfer animal models (Kreye J., et al. Brain, 2016).

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

The number of animals is based on the literature and on previous experience (Elmariah SB et al., 2005, Dalmau J. et al., 2008). As described below we will also make use of rest material of other rodent studies at Maastricht University to minimize the number of animals.

B. The animals

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

Rats will be used for this experiment, based on previous experience. Wistar female pregnant rats is the most suitable strain for primary cell culture and brain tissue material based on the literature (however no strain and gender changes has been observed using brains for IHC in our group), while Lewis male rats are the most convenient for sciatic nerve transection due to the biggest size (directly proportional to the muscle and AChR) (e.g. 9 week old Wistar male rat with 275g weight aprox.).

We estimate to use one pregnant rat (~10 embryos/pups) per month, so in a period of 5 years: 60 mothers.

Animals will only be sacrificed upon need. According to the patient material available, one or two animals at a time will be sacrificed. It is known that 1 animal serves around 100 usable brain slides, which will each allow testing one human sample for antibody presence. We expect to need around 2 animals per month, which means 120 rats over a period of 5 years. However, we are currently already performing this method with tissue from other department of the University which is giving sufficient supply for our current experiments and we already have a biobank of around 15 brains for this purpose, so numbers are likely to be much lower (or even zero) if other departments continue doing similar experiments.

For the denervation experiment, an estimated number of 18 adult male Lewis rats will be used based on previous experience. We use adult rats, because we want an antibody repertoire of the adult tissue. In the other appendixes included in this proposal, we will need AChR for about 1500 antibody determinations/experiment with a maximum of 3 repetitions. For each determination, it is necessary to have 150 µl of receptor in solution, which means a total of 675 ml of AChR receptor solution ($1500 \times 3 \times 0.150 = 675 \text{ ml}$). In the RIA the standard curve corrects for the concentration of antigen. From an adult rat, 37.5 g of muscle tissue is suited for receptor isolation and taking into account the conversion factor of 600 ml receptor suspension/500g muscle, only 45 ml of receptor solution can be obtained from each individual ($600 \text{ ml} / (500 \text{ g} / 37.5 \text{ g/rat}) = 45 \text{ ml/rat}$). Based on these values, 15 animals will be required to provide enough antigen for the assays proposed. However, experiments in the past have shown that there is a failure rate of 15 % in animals undergoing sciatic nerve transection surgery. Therefore, three additional animals are necessary. In total, we use a max. of 18 male rats.

For polyclonal antibody generation, animals with a strong immune response are recommended taking

into account also that the material obtained from them will be larger. Because of this, female rabbits are the best option for large quantities. Alternatively, we will use rodents because this is the target animal for passive transfer models. We have planned to generate antibodies against a maximum of 6 different antigens and for each we will use a maximum of 15 animals (based on previous experience, which means maximally 90 animals for this purpose). Additionally, we will use mice for monoclonal antibody generation. In that case, we will use maximal 10 animals per antigen (6 antigens), so a total of 60 mice.

A total (maximum) of 348 animals (198 rats, 90 rabbits, and 60 mice) are included in this appendix. All animals will be obtained from a registered supplier. These numbers

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.

Concerning refinement, the animals will be housed in groups and with enriched cages to allow species typical behavior. We do not expect any discomfort as the animals will not undergo any procedures in the primary neuronal cell culture and brain slices but we expect moderate discomfort in the sciatic nerve resection. For antibody production, refinement will take place by using anaesthesia and analgesia for the invasive procedures which minimize the discomfort of the animals.

Concerning generation of antigenic tissue, replacement by e.g. cell lines is not possible, because cancer cell lines express many antigens that create background staining of the human antibodies and thereby false positive results.

- For antigen specific tests, some expression systems for e.g. NMDAr, AMPAr, LGI1, and Caspr2 are available and we are using those.
- No cell line exists which overexpresses the receptors/ion channels (complex membrane channel, composed of 4 or more subunits) for this purpose taking into account international guidelines.
- For brain material source, if no embryonic primary cell lines are required, we will ask for rats of other animal studies or we will use, in case a denervation experiment is running, the brains from those animals. Human brain tissue is not an option to use in IHC, since the amount of tissue we can access is low, the quality and fixation of post-mortem human tissue is not of sufficient quality and the size of the human brain is too large, requiring an unrealistic amount of human serum to be tested.

Concerning the production of antibodies, we will only make use of animals in case there is no hybridoma or expression vector available for producing the antibody targeting the antigen of interest.

- Rabbits are the most suitable specie to generate antibodies *in vivo* but as a replacement Lewis female rat are also a good option based on their enhanced immune response described when generating active immunization models.

Reduction will be considered by using surplus animals when available for the isolation of brains and also the brains from the pregnant female and the rat males used for AChR insolation. For the primary cell culture of neuronal tissue, we are currently trying to set up the technique using 1 day postnatal animals since some groups are regularly working with these animals in the university and they don't need the brain.

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

The well-being of animals will be checked daily and in case of severe suffering or disease (not expected) animals will be sacrificed according to the human endpoints.

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 tissue will be used to characterize autoantibodies in patient serum or CSF or to determine antibody presence in autoimmune models described in all the other appendices. We are analysing sera and CSF of individuals that have not been characterized before. This is assured by communicating with the clinical center that provides the patient material. To our knowledge from conferences and literature there are still many autoantibodies to neuronal antigens still unknown of which the function is not studied.

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

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.

The animals will be anesthetized during the nerve transection. Additionally, we will use pain killers pre and post-operatively. For antibody production, analgesia will be administered in case of discomfort on the injection site. Optimal procedures will be discussed and decided on with the local IvD/AWB when writing the working protocols.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Due to nerve transection we expect locomotion impairments and possibly pain development of the wound after the surgery. From immunization with antigenic molecules, we expect the development of normal autoimmune reaction including inflammation and starting symptoms of the disease. From the use of adjuvants we expect pain in the injection area and an exacerbated immune reaction.

Explain why these effects may emerge.

The only discomfort could arise from complications in the pregnancy and sciatic nerve transection. The transection can impair movement of the hind limbs or paralysis for 48 hours after surgery. For the last issue, analgesia will be administered to the animal if required. Post-operative (also after immunization) analgesia will be applied for min. 3 days post-operative, prolongation upon indication.

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

Animals will be monitored daily. If any adverse reactions occur (not expected) the experiment will be halted. The discomfort generated by the nerve transection will be diminished with the use of pain killers pre and post-surgery. If animals have problems feeding, we will make use of liquid food or extra rich food to increase the weight or keep it constant. We will also make sure that the animals are able to reach food and water at all times. The discomfort generated by antigen immunization will be covered with analgesics. Humane endpoints will be applied.

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.

Humane endpoints will be applied in case of rapid weight loss (>20% within 3 days without any improvement), severe acute inflammation at the immunization point (untreatable by the definition of the veterinarian) and in case of self-mutilation or autotomy after nerve transection. It is important to mention that according to our experience, none of the animals followed these behavior, even receiving a bilateral transection.

The following endpoints are unlikely, but for completeness we include them since some phenotypes have never been tested before. These include prolonged diarrhea (>3 days), coughing, self-induced trauma, icterus and severe ulceration or bleeding (Recognition of pain and distress, Principles of Laboratory Animal Science, 2001).

Indicate the likely incidence.

We expect 0-0.5% of cases will require humane endpoints. We do not expect any problem from the pregnant rats to obtain primary cell cultures and brain tissue. For denervated animals, animals can suffer discomfort due to the paralysis and stress related. For *in vitro* autoantibody generation we do not expect any severe symptomatology since the duration of the experiment will not allow the development of it.

K. Classification of severity of procedures

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

The procedure is a non-recovery procedure for neuronal tissue generation and organ collection. In the case of sciatic nerve denervation, the discomfort is moderate. The discomfort generated by the nerve transection will be diminished with the use of pain killers pre/post-surgery. Later on the discomfort is based on the paralysis of the hind legs. The animals will be able to move crawling 48h post-surgery and they will be sacrificed after a period of 2 weeks. The discomfort related with the antibody production will be moderate, due to the immunization with incomplete Freund adjuvant or similar and the animals will only suffer an immune reaction with a mild expression of the disease).

References:

Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet neurology*. 2008;7(12):1091-1098. doi:10.1016/S1474-4422(08)70224-2.).

Elmariah SB, Oh EJ, Hughes EG, Balice-Gordon RJ Astrocytes regulate inhibitory synapse formation via Trk-mediated modulation of postsynaptic GABAA receptors. *J Neurosci*. 2005 Apr 6; 25(14):3638-50.

Kreye J, Wenke NK, Chayka M, Leubner J, Murugan R, Maier N, et al. Human cerebrospinal fluid monoclonal N-methyl-D-aspartate receptor autoantibodies are sufficient for encephalitis pathogenesis. *Brain* 2016; 139 (Pt 10): 2641–52. doi:10.1093/brain/aww208

Lancaster E, Lai M, Peng X, Hughes E, Constantinescu R, Raizer J, Friedman D, Skeen MB, Grisold W, Kimura A, Ohta K, Iizuka T, Guzman M, Graus F, Moss SJ, Balice-Gordon R, Dalmau J. Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *Lancet Neurol*. 2010 Jan;9(1):67-76. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70324-2

Meizan Lai, Ethan G. Hughes, Xiaoyu Peng, Lei Zhou, Amy J. Gleichman, Huidy Shu MD, Sabrina Matà, Daniel Kremens, Roberta Vitaliani , Michael D. Geschwind, Luis Bataller, Robert G. Kalb, Rebecca Davis, Francesc Graus, David R. Lynch, Rita Balice-Gordon, Josep Dalmau. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Annals of Neurology*. 2009 Apr;65, (4): 424–434. doi 10.1002/ana.21589

Rochkind S. and Shainberg A.. Protective Effect of Laser Phototherapy on Acetylcholine Receptors and Creatine Kinase Activity in Denervated Muscle. *Photomedicine and Laser Surgery*. October 2013, 31(10): 499-504. doi:10.1089/pho.2013.3537.

Zutphen L. F. M. Van, Baumans V., Beynen A. C.. Recognition of pain and distress .Principles of Laboratory Animal Science, Revised Edition, 1st Edition, 2001.

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.

It is necessary to sacrifice the animals to extract cells to start primary cell culture or extract antigenic and antibody tissue.

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

- a) This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- b) A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- c) For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- d) 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'.	10700	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	University Maastricht	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	2	Active immunization in rodents

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 development of active immunization rodent models for autoimmune mediated diseases that target antigens in the nervous system. Depending on the antigen that is used to immunize the animals, different nervous system pathologies can be developed. We intend to immunize with neuronal receptors and ion channels leading to autoimmune encephalitis including N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) and other receptors (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; AMPAR and B gamma-aminobutyric acid receptor; GABABr) or channel associated proteins such as Leucine-rich glioma inactivated 1 (LGI1) or contactin associated protein 2 (Caspr2) which are associated to the voltage gated potassium channel (VGKC), but also antigens in the peripheral nervous system (PNS), expressed in the neuromuscular junction (NMJ), which includes the acetylcholine receptor (AChR), muscarinic kinase receptor (MuSK) and LDL receptor related protein 4 (Lrp4). The injection of any of these antigens (generated in appendix 1 using animals or commercial or recombinant origin) is used to produce an animal model of the disease and/or to study the pathologic progression/mechanisms of the disease and the symptoms induced in the animals. For example, it has been proven in myasthenia gravis (MG), where the injection of MuSK or AChR develop MG and are already well established animal models for autoimmunity (experimental autoimmune myasthenia gravis or EAMG). For central nervous system (CNS) antigens, active immunization has been performed in some pathologies like Multiple sclerosis (MS) where myelin proteins are injected to develop an inflammation model called experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Denic A. et al., 2013; Mix E. et al., 2010). This give direct evidence and supports the hypothesis that the injection of the antigen will develop the disorder in an animal model. An autoimmune disease can be either T-cell or B-cell mediated (or a combination of both). To determine what the driving pathogenic force is, the immunized animals will be used to isolate antibodies, T-cell and B-cells and each fraction can subsequently be transferred to naïve animals (passive transfer) to test pathogenicity (which is described in

Appendix 3).

The antigen will be obtained from one of the following sources, depending on the state of research:

- a) External sources: electric organ of the *Torpedo californica*, recombinant autoantibodies, *in vitro* systems based on the production of the antigen of interest using eukaryotic cell lines (recombinant DNA in prokaryotic and eukaryotic systems) or any other antigenic SOURCE used to immunize and generate a nervous system autoimmune animal model of interest.
- b) In house generation: as described in Appendix 1, the antigenic and antibody molecules have to be, in some cases, in house generated because they are not commercially available. AChR will be obtained from denervated muscle rat (since *in vitro* methods do not produce enough antigen for this purpose), brain expressed antigens will be obtained from rat brains and primary cell cultures from rat embryos and *in vitro* generated antibodies will be obtained by antigen immunization in rodents. Some of the material will be also used to screen patients' plasma/sera or CSF to identify new pathogenic antigens (e.g. rat brain tissue for immunohistochemistry using patient sera).

The antigen will be administered peripherally (sub cutaneous (s.c.)) to the animal.

The primary outcome is the generation and characterization of autoimmune models targeting the nervous system and will include behavioral (symptomatic), neurological and locomotor tests, followed by post mortem analysis to describe the production of antibodies, T-cells and B-cells and the pathogenic mechanisms of autoantibodies.

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

The immunization varies on the animal model as described above. The frequency is also determined by several parameters like the immunogenicity and stability of the antigen, the severity of the induced disease, etc. with a minimum of a unique immunization at the beginning to a weekly injection until the end of the experiment. Additionally to the antigen, we will use immunogenic reagents to exacerbate the immune reaction since a strong immune response and a break in the tolerance to self-antigens are required to generate an autoimmune model. For this purpose we will use Complete Freund's Adjuvant (CFA) which will be mix with the antigen of interest in an emulsion, injected s.c. in 4 different places in the base of the tail (incomplete FA (IFA) will be used in case of repetitive immunizations (Li, 2004)). CFA will be used to generate the animal models following international guidelines for reproducible and reliable autoimmune models in MG (██████████ et al., 2015) and other models like collagen-induced arthritis (Brand DD. et al., 2007), autoimmune uveitis (Bansal S. et al., 2015), Tourette syndrome animal model (Horning M. and Lipkin W.I., 2010), experimental autoimmune encephalitis (Randohoff R.M., 2012; Denic A. et al., 2013) or experimental allergic encephalomyelitis (Pachner A.R., 2011) among others. The duration of the experiment varies between 6 to 9 weeks.

- a) For the development of a disease, animal models will be generated by a single immunization or weekly immunizations as a maximum frequency, in the same way but studied for up to 9 weeks (chronic model) in case of repetitive immunizations the first immunization will be performed using CFA and the following/s using incomplete FA (IFA) (Li, 2004). During this time, animals will perform different behavioral and neurological tests as described below and will be sacrificed at different time points to analyze pathogenicity and signs of inflammation. Also the blood (obtained from saphenous vein, every 3-10 days maximum, following the NC3R guidelines for blood sampling) will be analyzed for antibody titers, total IgG and antigen specific IgG and leukocyte populations during the disease progression. This will be useful to study progression of the autoimmune disorders induced which can be correlated with behavior, neurologic and locomotor data.

Control groups are required in all experiments. We will include 3 groups of animals:

1. Animals injected with the antigen + CFA; animal model
2. Animals injected with saline + CFA; control 1, animal without the disease
3. Animals injected with saline; control 2, animal without any immunogen agent injected

With this approach we will be able to know the specific effect of the antigen, by analyzing the effect of the antigen and the effect of the CFA. It is also important to define the effect of CFA since this has never been tested before and maybe it enhances the pain and discomfort sensation in the animals. In case pain is tested, animals without any intervention have to be included to have the basal/physiological level of this measurement.

The motor, neurologic and behavioral battery set up will depend on the nature of the disorders. Also, from each animal model, the batch of tests will be selected to answer the questions as accurately as possible. Every antigen will induce a specific group of symptoms. Some examples of which we expect to study with the associated symptoms are depicted in the table below.

Table 1. [Redacted]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted] before. All possible tests have been mentioned in the Table 2 (below). The combination of the tests selected IS disease specific AND is defined according to the pathology and the research question. The choices of the test that we will perform will be based on the latest literature for each pathology reported (Table 1) and on the availability of the tests in our department. It is important to mention that not all the animals in the same experiment will follow the same set of tests, since some of them are incompatible. Some tests have to be performed regularly as described in the Table 2 and others just once, where some others are terminal experiments.

Table 2. Procedures required characterizing neuropsychiatric animal models. Tests are classified according to the main outcome and the character of it: behavior, neurologic and locomotion. A brief description per test and the degree of invasiveness and discomfort has been included.

Procedure/test	Description	Main outcome	Example	Invasive/ non invasive// discomfort	Behavior/ neurologic/ locomotion/ operational
1. Alternating Y-maze (Hughes RN., 2004)	The animal is introduced in the center of a Y-shaped maze with three white opaque arms. The number of arm entries and the percent of alternations are calculated.	Willingness to explore new environments. Cognitive working memory.	Individuals with cognitive deficits perform less alternation compared to wild type (WT) animals due to the deficit in cognitive working memory.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (cognition)
2. Black and white	The animal is introduced	Anxiety and	The preference by	Non invasive	Behavior (affect)

test box (Costall B. et al., 1989)	into a box with bright and dark areas. The preference light/dark areas are measured.	exploratory behavior.	dark areas can be silenced by anxiolytic drugs.	// Mild discomfort (anxiety)	
3. Catwalk (Deacon R.M.J., 2013)	The animal traverses a glass plate voluntarily and the footprints are recorded.	Locomotor activity and nociception.	Minimal physical interference and pain behaviors can be detected and analyzed (different patterns) by this method. Analgesic efficiency can be evaluated.	Non invasive // Mild discomfort	Locomotion
4. Cued and Contextual Fear Conditioning (Curzon P. et al., 2009)	The animal is placed in a box where different expected/unexpected stimulus (light, tone, odor) will be presented. The animal will freeze when an unexpected stimulus is presented. The percentage spent freezing and time for extinction will be measured.	Associative learning and memory (amygdala-hippocampus dependent).	Rodent models with cognitive deficits show less freezing during both cued and context freezing after having been conditioned. Furthermore, they show faster extinction of conditioning compared to WT animals.	Non invasive // Moderate discomfort	Behavior (cognition)
5. Electromyography (EMG) (Osuchowski M.F., et al., 2009)	Different electrodes are located in the paw and in the tail. The time required to transport the electric signal is recorded.	Skeletal muscle electric activity.	In MG rats, EMG is useful to record the degeneration of the muscles and the progression disease.	Invasive// Mild discomfort (under anesthesia, terminal experiment)	Neurologic
6. Elevated zero maze test (Kulkarni SK. et al., 2007)	Animals are displaced in an annular or "X" shape elevated platform with open and enclosed quadrants. The time spent in enclosed areas is measured.	Anxiety.	In rodent with cognitive deficits, spent less time in the enclosed arms compared to WT animals, indicating memory deficits.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect)
7. Encephalography (EEG) (Xie C. et al., 2011)	Brain spontaneous activity is measured and recorded from multiple electrodes placed on the scalp. <u>A video recording is necessary to confirm epileptic seizures.</u>	Electrical brain activity and epileptic seizures.	Epileptic events and encephalopathies can be diagnosed by this method in animal models.	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia)	Neurologic
8. Forced swimming tests (Can A. et al., 2012)	The animal is placed in a cylindrical tank with water (the bottom is not reachable and they can not scape from the container). The time spent trying to escape/swim/float is recorded.	Anhedonia, depressive-like behavior	Anti-depressant therapies can be tested using this technique.	Non invasive // Moderate discomfort (anxiety and stress)	Behavior (affect)
9. Horizontal and	The animal is placed in	Motor function,	The animal get a	Non invasive	Locomotion and

fixed bars (Deacon RMJ. 2013)	the middle of a horizontal suspended bar (with different diameters) where they need to walk without falling. In the fixed bars, the different diameters bars are fixed and they need to go from one end of the stick to the base.	orientation and coordination	composite score: time spent on the bar without falling, capacity to reach the base of the apparatus and the diameter of the bar. Animals with neurological or locomotor issues will have difficulties and fall soon.	// Mild discomfort	neurologic
10. Intubation (██████ et al., 2015)	Artificial ventilation is provided to the animal through a trachea incision, placing a tube connecting to air flow.	Ensure breathing	Electromyography is a procedure where curare is injected, blocking all muscles making artificial ventilation necessary.	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia, terminal experiment)	Operational
11. Morris Water Maze (Vorhees CV. and Williams MT., 2008)	The rodent is placed in a swimming arena where a submerged platform is located in a strategic place. The time spent to learn will determine the spatial learning and later on the time spent to find the platform will be correlated with the reference memory (the arena is divided by 4 quadrants).	Spatial learning and memory hippocampus dependent. Swimming skills	Rodents with cognitive deficits will spend less time in the target quadrant, because they forgot where it was. The swimming speed can also be measured to determine the locomotion status.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (cognition) and locomotion
12. Nerve conductance speed (NCS) (Osuchowski M. et al., 2009; ████████ et al., 2015)	Electrodes are placed in the leg and on the tail of the animal. The time required to receive the stimulus from the emitting and the receiving is recorded and correlated with the nervous and muscle status	Nerve damage and neuropathic measurement	Nerve damage can be measured using this technique for example for sciatic nerve impairment. Neuropathy can be tested also as a drug side effect using this technique	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia)	Neurologic
13. Object recognition task (Leger M. et al., 2013)	Two similar objects are presented to the animal for the first time and the second time one of them is replaced by a new object. Object exploration duration and habituation times can be analyzed.	Cognition and recognition memory	Animals with cognition impairment will spend more time to recognize the constant and the new object.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (cognition)
14. Olfactory function /Smell threshold concentration test (Yang M. et al.,	Animals are exposed to increasing concentrations of menthol diluted in mineral oil and the minimal menthol	Olfactory function and depression like-behavior	A depressive like behavior is related to decreased olfactory function, so animals with depression will	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (affect)

2009; Katzay A. et al., 2014)	concentration that the mouse responds to is recorded. A mouse response is considered positive when it displays a sharp aversive movement away from the source of smell.		need a stronger olfactory stimulus for positive reaction		
15. Open Field Test (Bailey KR. And Crawley JN., 2009)	The animal is placed in a square chamber, divided in areas. A recording system will determine the preference of the animal between the periphery and the central areas. In parallel, distance and speed, rare behaviors, grooming, etc. can be evaluated.	Locomotion, emotional and anxiety.	Rodent models with cognitive deficits or treated with anxiolytic drugs will show reduced time spent in corners due to reduced anxiety.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect) and locomotion
16. Parallel rod floor test (Kamens HM and Crabbe JC., 2007)	The animal is placed in a parallel stainless steel rod with a base plate behind. The animal paws are recoded and the number of times they slip through the parallel metal rods and touches the base plate.	Motor coordination (ataxia) and activity.	In rodent with cognitive deficits, locomotion deficits have been observed.	Non invasive //Mild discomfort	Locomotion
17. Perfusion (██████████ et al., 2010; ██████████ et al., 2015)	The animal is injected in the central venous system with a reagent (PBS or a fixative)/ The liquid is injected in the left atrium and a cut in the right ventricle drain the liquid.	Remove blood and/or preserve the tissue and organs.	Muscles in MG animal models have to be analyzed ab for this, fixed material is necessary because it help to maintain the integrity of the proteins. Brain is another important organ where sometimes the blood has to be removed or the tissue has to be fixed.	Invasive// Mild discomfort (under anesthesia, terminal experiment)	Operational
18. Pre-pulse inhibition (PPI) (Powel SB et al., 2009)	The animal receives a weak prestimulus o prepulse that results in the inhibition of the reaction of the animal after a subsequent strong startling stimulus or pulse (usually acoustic or light stimulus).	Anhedonia, depressive-like behavior	PPI has been used primarily in pharmacological animal models to screen putative antipsychotic medications. It is considered to be one of the most promising neurophysiological indexes for translational research in psychiatry (Hidetoshi T et al.,	Non invasive // Mild discomfort	Behaviour (affect)

			2011).		
19. Rack grabbing test (██████████ et al., 2010; ██████████ et al., 2015)	The animal is held by the tail and a 300g metal rack has to be grabbed repeatedly (5 times with a resting interval of 30s aprox.).	Strength, weakness and fatigability. Depressive-like behaviors.	MG animal models or other muscle impaired models can be graded using this method by the number of repetitions and the time they grab the rack.	Non invasive //Mild discomfort (anxiety)	Locomotion, Behavior (affect)
20. Resident-intruder tests (Koolhaas JM. et al., 2013)	The animal is placed in a box, first with a sterile female and later with a male from a non-aggressive strain. Social interaction and stereotypical aggressive behaviors are recorded and later analyzed by the frequency of these activities.	Social interaction, stress and aggressiveness/violence.	The social and communication skills and the locomotion can be measured in transgenic mice, where the animals presented more violence. Also the drug effect can be studied in terms of clarity and aggressiveness.	Non invasive //Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect) and locomotion
21. Rotarod (Deacon RMJ. 2013)	The animal is placed in a horizontal cylinder (delimitated on the sides). The cylinder rotate at different increasing speeds and the animal have to walk without falling.	Motor function and coordination	The animal gets a composite score: ledge test, hind limb clasping, gait, kyphosis (locomotion) and time spent. Animals with neurological or locomotor issues will have difficulties and fall soon.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Locomotion and neurologic
22. Social interaction test (Kaidanovich-Bejilin O. et al., 2011; Sato A. et al., 2013)	The animal is placed in a 3 chamber cage. After habituation, the preference between an empty/known animal/unknown animal is measured. The activity is recorded and number and time spend in each department counted.	Natural sociability and preference novel sociability.	Many neuropsychiatric disorders are characterized by social behavior and recognition disruption. Other locomotion and cognitive parameters can be recorded.	Non invasive //Mild discomfort	Behavior and locomotion (affect)
23. Spatial Y-maze, X-maze and V-maze spontaneous alternation test (Lainiola M. et al., 2014)	The animal is placed in the connection of a 3 arm maze and the exploring capacity is measured by the number of arm entries/alternation. Different objects can be placed at the end of the arms.	Cognitive deficits, memory, anxiety	Transgenic animals or drug effect can be analyzed in the cognitive level using this method, measuring the willingness of rodents to explore new environments. Memory deficits can be measured also by the time spent to recognize the objects.	Non invasive //Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect/ cognition)
24. Sucrose	The rodent is free to	Anhedonia and	In chronic stress	Non invasive	Behavior (affect)

preference/anhedonia test (Strekalova T. et al., 2004)	choose between a water/sucrose solutions. The % of preference sucrose/liquid consumed is used as criteria (threshold 65%).	depression-like behaviors	animal model, depression like behavior shows the acuteness of the model with a reduction of sucrose consumption.	// Mild discomfort	
25. Tail suspension test [redacted] et al., 2010; [redacted] et al., 2015)	The animal is held by the tail and they need to climb on the top of the hand repeatedly (5 times with a resting interval of 30s approx.).	Strength, weakness, fatigability. Stress and depressive-like behaviors.	In MG rats, this is a parameter used to observe the acuteness of the disease. Animals exposed to tail suspension for longer periods daily develop chronic stress.	Non invasive //Mild discomfort (anxiety)	Locomotion and behavior (affect)
26. Venipuncture	A needle is used to puncture an occluded vessel (saphenous vein or submandibular venous sinus). The blood start dripping and after collecting the required amount, you have to press the area to stop the bleeding.	Obtaining a blood sample.	Blood contains a lot of parameters that can be studied in order to monitor autoimmune state in animal disease models like MG, encephalitis, etc. Drug side effects can also be assessed by blood analysis.	Invasive // Mild discomfort	Operational
27. Von Frey and Hargraves (Krzyzanowska A. And Avedaño C., 2012)	The animal is subjected to different thermic and mechanic increasing intensity stimulus. The maximum intensity the animal can withstand without reaction is recorded as a threshold.	Pain susceptibility/nociception.	Animal models can be tested by this method to assess the susceptibility to pain which reflect their own welfare. Could be an indirect measurement of therapy efficiency or to detect side effects. It also helps to determine the general health.	Non invasive // Moderate discomfort	Behavior (pain)
28. Weight measurement	Animals are placed in a balance and the weight is recorded.	General health.	Weight is a general measurement related with general health, disease progression (for example in MG) and drug side effects.	Non invasive //Mild discomfort	Operational

All animals will undergo A behavioral-neurological-locomotor battery adjusted to the induced disease, varying from 2-15 the amount of tests/procedures per animal distributed along the experiment ([redacted], et al., 2011; Planaguma J. et al., 2015).

An example of CNS passive transfer models with cognitive impairment, is the one performed by Planaguma J. and colleagues, where the animals are characterized using the novel object recognition in open field and V-maze task, sucrose preference/anhedonia test, tail suspension and forced swimming tests, black and white and elevated plus maze tests, resident-intruder test and horizontal and vertical activity assessment. The tasks are performed once to weekly frequency. In our case, we have designed a set of tasks based on 5 domains (specified in Table 2), since the literature is quite terse and the models we will develop might not follow the same pathological mechanisms having different impairments. Based on these domains, we have select a first line tests which will be the first ones applied to characterize the

animal model:

- 1) Affect: Elevated zero maze test, sucrose preference test and pre-pulse inhibition
- 2) Cognition: Alternating Y-maze and object recognition task
- 3) Motor: Open field and rotarod
- 4) Pain: Von Frey
- 5) Neurologic: Electroencephalography

After the analysis of the first results, a more specific batch of test will be applied to the specific animal model, focusing on the domains affected. We expect differences in 2-3 domains and we will undertake a maximum of 3 tasks per domain to characterize the animal model in a proper way in those areas where the phenotype is altered (see Table 2). An example of it is the Resident-intruder test or the social interaction, which will introduce more power to an aggressive or abnormal behavior, already observed when the animal is placed in a box with others. The tests will be chosen based on the non-overlapping of outcomes and the non-alteration (bias) of the results because of the application of all of them together. In case those interactions between tests are observed at mid-term evaluation of the results, each group will be subdivided and the animals will follow different set of tasks, reducing in this way the bias.

For the PNS a different battery of task will be applied based on previous experience or recent literature. An example of the batch of tests performed in an active immunization MG model for a drug experiment is (██████████ et al., 2010):

1. Motor: Rack grabbing test and tail suspension test
2. Pain: Von Frey and Hargreaves tests
3. Neurologic: nerve conductance speed and electromyography

Besides the cognition, neurologic and locomotor assessment, some other operational task may be applied to the animal models like general observation (not consider a test/task, since the animals will be checked routinely), venipuncture and weight measurements during the experiment and other terminal tasks like intubation or perfusion at the end of the experiment, depending on the specific purpose of the study.

All the tests/procedures applied to the animals are well established procedures under a standard protocol (Standardized operational protocol; SOP) which will reduce the bias of the experiment, since in these cases, interaction between the different tasks are already described and we will not make these specific set of tests for the experimental animals. In case it is necessary to include tasks that will affect each other because of the research question, the groups will be divided in subgroups which will follow different sets of tests. On the other hand, another measure to reduce the bias is the design of the tests performed in each experiment, which will be defined by the literature available currently before the performance of the experiments and also based on the expertise of people who has large experience in the behavior test. Under their advice, the tests will be chosen following a stress increasing scale throughout the experiment (in example, an open field will be always performed before a forced swimming test). It is important to mention that all observers (minimum of 2 independent researchers) will be blinded to different groups when performing the tasks.

For this appendix the go/ no-go criteria are the following:

1. Animal phenotype

- a) Robust and standard: analysis on the different behavior, neurologic and/or locomotion tasks will be performed as well as *in vitro* analysis defining the levels of different markers involved in autoimmunity like autoantibodies (specific and unspecific), inflammation cells and molecules e.g. plasma cells and cytokines. For standard animal models, the non-reproduction of the symptomatology and other markers is a direct no-go criteria, taking into account the variance between experiments (██████████ et al., 2015). For novel animal models, if no differences equal or higher than 10% between the disease and the control group are found, a no-go decision will be followed. In this case, the experimental conditions of the model will be studied in detail, and changes (e.g. species, gender, route of administration, frequency, dose, adjuvants, etc.) will be implemented to try to generate a robust and standard animal model. If no differences are found after modifying the strategy, we will report the results as a non-successful or non-viable model for the specific antigen of interest.
- b) Severe: the symptomatology of the animal model will be observed and in case of severe discomfort and/or pain because of the intervention procedures (e.g. immunization), analgesic

will be applied and if even using this the animal keep suffering, a no-go decision will be followed as explained in point a). If animals reach humane endpoints (section J), they will be sacrificed.

2. Test battery

After the analysis of the results of the battery tests, a go/no go decision will followed. In case an animal model shows differences in one of the domains and not in the other, the number of tasks assessing this parameter will be increased and the other test removed from the batch. Moreover, some tests included in Table 2 will be performed in case a strange behavior is observed during routine observation. It is important to mention that, the behavioral battery may change based on results generated from the first groups tested (based on a go/no-go decision after a first characterization in case of CNS active immunization models). For example:

- a) When the animal model is new, a characterization of the results in each test will provide an overview of the effect of each antigen specific immunization in the animal model, so a go decision will be followed in this case up to enough reliable data is available.
- b) In case of new animal models when a test has been shown (see previous point a)) not to detect differences between groups using a positive and a negative control, it will be discarded from the behavioral battery for this specific animal model (this indicates that the test for that particular model is not useful (no go decision)).
- c) When the animal model is well characterized and the results from the test are unexpected, showing no differences between the groups, a no-go decision will be followed.

For the postmortem study, CSF and blood will be collected for analysis of different molecule levels (e.g. total immunoglobulin levels and specific isotypes and antigen specific immunoglobulin or other factors affected) and cell populations will be studied as well to see how different immune system related cells and molecules can vary due to the disease. On the other hand, tissues will be collected to be analyzed. Immune related organs – thymus, spleen, lymph nodes, bone marrow –, brain, muscles and other organs which can be affected specifically by the disease developed – intestines, gut, sciatic nerve, liver, kidney, etc.-. For tissue collection, based on the research question to be answered, different treatments can be applied to the tissue, being necessary to include in some experiments perfusion with different reagents (glutaraldehyde, paraformaldehyde, etc.) of the animals to obtain fixed tissue (e.g. for MG, 2% glutaraldehyde perfused muscles are necessary to study the neuromuscular junction structure).

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

The numbers of animals will be kept to a minimum by collaboration with people who have extensive experience in the generation of autoimmune animal models.

The research strategy will be based on the use of the most informative and descriptive test set for each disease model under the advice of experts in the field, own experience and the use of the literature. We will try to include as many tests as possible taking always into account the bias error and also we will avoid superfluous repetitions. As mentioned above, go/no-go decisions will be taken according to the pathology. If no differences are found using a test already reported to show significant differences, the experiment will be halted. In case there is no previous report about the test, the experiment will continue as a characterization (see above paragraph test battery).

We will use the effect size as a quantitative measurement of the strength of the phenotype of the animal model. Taking into account the next assumptions: a very large-huge effect size ($d=1.20-1.40$; Sawilowsky, S. Journal of Modern Applied Statistical Methods, 2009) and a power of 0.80 (Cohen J., Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences, 1988), with an $\alpha=0.05$ for two-tailed and $\alpha=0.025$ for one-tailed, we will need 9-12 animals per group.

As parameters we will use, in active immunization animal models: IgG titers and weight measurements with some phenotype characteristics (in case of CNS, all the tests proposed in the 5 domains that we will perform in the first pilot) to see whether there are differences or not between the animal model and the controls.

B. The animals

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

For this experiment, rodents, including mice and rats will be used. Different species, strain, and genetic background (also WT) animals can be included. The species (3), strain based on the genetic background, gender (2) and age range will be adjusted according to the literature to the most suitable. According to the induced nervous system autoimmune pathology, the onset severity and progression of the disease can vary and also the extension of the model.

- NMJ animal model using AChR is the only model already well established. We will use Lewis female rat, 8-12 weeks of age, are the most susceptible strain and gender for AChR active immunization (██████████ et al., 2015). Another point in favor to females is that the size of the animal is also important since the amounts of antigen required and the doses of drugs are directly correlated with the weight of them. Other antigens presents in the NMJ can be used to generate the animal models. In these cases, we will use at first the study design used for AChR animal model and the recent literature on the topic (currently there is no information available since we did not define the novel antigen yet).
- For other active immunization models, we will follow the literature available (Denic A. et al., 2013) and in case there is none, we will follow the criteria of other CNS autoimmune models (Planaguma J. et al., 2015, Jones M.V. et al., 2012) or other PNS active immunization models like MG (██████████ et al., 2015). The prevalence of the disorder gender specific in the human population can also be taken into account since the last aim of all research proposes are to reach the human level.

For the animal models of active immunization we will generate a maximum of 5 animal models. For these studies the amount needed depends on the purpose of the animal model (behavior, neurological and/or locomotor description, mechanisms of pathogenicity studies, drug test, new therapies implementation, etc.). We expect a max. of 204 individuals (in example, taking into account 4 groups; disease (20 animal) /healthy (12 animal) * condition "X" /control, in triplicate experiments: $((20*2+12*2)*3=192)$ an average of the animal number included in each active immunization models, since the genetic background of the animals, the number of conditions to be tested, etc. can be modified (for example, in case pain tests will be included, a non-immunized control group has to be included, so 12 more animals have to be included or the necessity to divide the groups in 2 subgroups because of the tasks overlapping: for example when a task measuring anxiety and another one measuring cognitive impairment cannot be applied in the same animal because one will interfere with the other and the results will not be reliable). In this calculation we have already taken into account that some animals will have the same conditions but will be sacrificed in different way according to the tissue analysis requirement and the high variability existent in active immunization models. In total we will not use more than 1020 animals for active immunization models ($204*5=1020$ animals).

Summarizing, a total of 1020 animals (816 rats and 204 mice) will be included in the "Active immunization in rodents" appendix.

All animals will be obtained from a registered supplier or a researcher who have specific animal models in case the registered supplier doesn't have it.

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.

Animal models of autoimmune diseases are required to study the *in vivo* pathogenic mechanisms, which will help to understand the procedures underlying the disease. There are no other *in vitro* experimental approaches that can give us this information, because the disease development in this case is very complex and dependent on the interplay of immune system and nervous system. Additionally, we aim to prove that the autoimmune disease can induce neurological and psychiatric symptoms which are difficult to measure in lower organisms.

The number of animals will be kept to the minimum that can give statistical differences by doing power calculations for sample size and implementing go/no-go criteria we further limit the amount of animals used.

Refinement will take place by using anaesthesia and analgesia for the invasive procedures, including pain due to the use of adjuvants during the immunization and the discomfort generated by the development of the pathology. Incomplete FA (IFA) will be used in case that repetitive immunizations are required (Li, 2004).

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

We are going to adapt the accommodation and the care to the need of the animals. To limit animal discomfort; anaesthesia and analgesia will be used to reduce the discomfort of the animals during the invasive procedures, like nerve conductance or for the terminal experiments like electromyography using curare where the animals have to be intubated and receive mechanical ventilation (for more details see Table 1). Animals which are going to follow pain susceptibility test could not be under anesthesia (will not have anesthesia during a certain period before the test is performed). Usually, pain tests are run in the middle of the experiment, enough time after the immunization and before the terminal experiments, so the anesthesia is not interfering in any case. Because of this, if some animal present high discomfort, the subject will be withdrawn (in any case, this is not what we expect, since these specific tests are performed in chronic models and the human endpoints are always taken into account).

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

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.

Animals will be monitored daily. Anaesthetics and analgesics will be used to reduce the pain and discomfort of the animals due to some procedures (immunization, NCS and EMG). In some cases (e.g. when it is important to assess pain as an outcome parameter), pain tests are going to be run during the experiment as a part of the model characterization and can also be used as a welfare measurement (in MG models pain is expected due to the immunization but in CNS models there is no previous data reporting this).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

We can expect adverse effect of the immunization and of the induced disease *per se*, for example, EAMG cause weakness and fatigability (including problems with food intake and difficulties to breathe or the appearance of elephant teeth) and in case of CNS, memory and some neurological and locomotor impaired abilities can be expected, which generate stress as explained more in detail in section A.

There are no adverse effects are expected in relation to the venipuncture or the NCS, neither in the behaviour nor in pain susceptibility tests.

Explain why these effects may emerge.

An unwanted effect could be observed because of immune reaction against the antigen and the adjuvant. The animal will undergo inflammation in the area of injection with possible pain. Pain killers will be administered if necessary. Furthermore, systemic inflammation might occur if the antibodies produced by the animals start reacting with endogenous proteins. Many of these antigens have never been used in rodent models and we cannot know how symptoms differ from the human disease onset and progression.

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

Regular monitoring will prevent and minimize the discomfort since the animals are going to receive pain killer, anaesthetics and/or analgesics in case they are necessary. The immunization site will be checked the days after the intervention to be sure that no complications appear. Humane endpoints will be defined specific for the pathology studied and in case the animal shows a severe discomfort, euthanasia will be performed if the individual reach that status.

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.

Humane endpoints will be applied in case of rapid weight loss (>20% within 3 days without any improvement—some autoimmune models have a transient acute phase of the disease which

spontaneously recovers), severe acute inflammation at the immunization point (untreatable by the definition of the veterinarian). The following endpoints are unlikely for completeness we include them since some phenotypes have never been tested before. These includes prolonged diarrhea (>3 days), coughing, self-induced trauma, icterus and severe ulceration or bleeding (Recognition of pain and distress, Principles of Laboratory Animal Science, 2001).

We expect neurological symptoms related with autoimmune models where the CNS is target. The incapability to perform the behaviour tasks, the inability to eat and drink (recognized by dehydration signs, weight loss and general body condition) or the presence of continuous tremors, status epilepticus or circling (symptoms from what the animal will not recover) are non expected symptoms that, in case of occur, will be taken as a humane endpoint and the animal will be sacrificed.

In case of generalized unexpected severe adverse reaction the experiment will be halted.

Indicate the likely incidence.

The severity of the induced pathology fluctuates since acute or chronic illness can be induced depending on the dose, frequency and duration of the immunization (Lennon V. et al., 1975; ██████████ et al., 2015).

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').

All the animals will experience some degree of discomfort. The intermediate analysis of the behavioral, neurologic and/or locomotion tests cause mild to moderate discomfort. Operational procedures generate mild discomfort in 100% cases, however, immunization evokes moderate discomfort (single immunization with CFA and repetitive immunizations with IFA). Since all the animals will undergo immunization (except the control group for pain tests, which will not have CFA injection), the added discomfort of all tasks is moderate.

References:

Agnieszka Krzyzanowska and Carlos Avendaño. Behavioral testing in rodent models of orofacial neuropathic and inflammatory pain. *Brain Behav.* 2012; 2(5): 678–697.

Andrew R. Pachner. Experimental models of multiple sclerosis. *Current Opinion in Neurology* 2011, 24:291–299

Atsushi Sato, Masashi Mizuguchi, Kazutaka Ikeda. Social interaction test: a sensitive method for examining autism-related behavioral deficits. *Protocol exchange | Community contributed.* 2013: doi:10.1038/protex.2013.046

Bailey KR, Crawley JN. Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5221/>

Bansal S, Barathi VA, Iwata D, Agrawal R. Experimental autoimmune uveitis and other animal models of uveitis: An update. *Indian J Ophthalmol.* 2015 Mar;63(3):211-8. doi: 10.4103/0301-4738.156914.

Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc.* 2007;2(5):1269-75.

Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD. The Mouse Forced Swim Test. *Journal of Visualized Experiments : JoVE.* 2012;(59):3638. doi:10.3791/3638.

Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989; 32(3):777-85.

Curzon P, Rustay NR, Browman KE. Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5223/>

Deacon RMJ. Measuring Motor Coordination in Mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE.* 2013;(75):2609. doi:10.3791/2609.

Denic A., Johnson AJ, Bieber AJ., Warrington AE., Rodriguez M., and Pirko I.. The Relevance of Animal Models in Multiple Sclerosis Research. *Pathophysiology.* 2011; 18(1): 10.

Hidetoshi Takahashi, Ryota Hashimoto, Masao Iwase, Ryouhei Ishii, Yoko Kamio, and Masatoshi Takeda. Prepulse Inhibition of Startle Response: Recent Advances in Human Studies of Psychiatric Disease. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2011 Dec; 9(3): 102–110. doi: 10.9758/cpn.2011.9.3.102

Hornig M, Lipkin WI. Immune-mediated animal models of Tourette syndrome. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013 Jul;37(6):1120-38. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.01.007.

Hughes RN, The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. 2004; 28(5):497-505.

Jones MV., Collongues N., de Seze J., Kinoshita M., Nakatsuji Y., Levy M. Review of Animal Models of Neuromyelitis Optica. *Mult Scler Relat Disord*. 2012; 1(4): 174–179.

Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR. Assessment of Social Interaction Behaviors. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 2011;(48):2473. doi:10.3791/2473.

Kamens HM, Crabbe JC. The parallel rod floor test: a measure of ataxia in mice. *Nature protocols* 2007;2(2):277-81. doi:10.1038/nprot.2007.19

Katzav A, Ben-Ziv T, Blank M, Pick CG, Shoenfeld Y, Chapman J. Antibody-specific behavioral effects: Intracerebroventricular injection of antiphospholipid antibodies induces hyperactive behavior while anti-ribosomal-P antibodies induces depression and smell deficits in mice. *Journal of Neuroimmunology*, 2014: 272(1-2), 10–15.

Kirkwood, James and Hubrecht, Robert. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*. Wiley-Blackwell, 2010. p. 29. ISBN 1-4051-7523-0.

Koolhaas JM, Coppens CM, de Boer SF, Buwalda B, Meerlo P, Timmermans PJA. The Resident-intruder Paradigm: A Standardized Test for Aggression, Violence and Social Stress. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 2013;(77):4367. doi:10.3791/4367.

Kulkarni SK1, Singh K, Bishnoi M. Elevated zero maze: a paradigm to evaluate antianxiety effects of drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2007;29(5):343-8.

Lainiola M, Procaccini C, Linden AM. mGluR3 knockout mice show a working memory defect and an enhanced response to MK-801 in the T- and Y-maze cognitive tests. *Behav Brain Res*. 2014: 1 (266) 94-103. doi: 10.1016/j.bbr.2014.03.008.

Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P. Object recognition test in mice. *Nature Protocols*. 2013; (8) 2531–2537.

Lennon VA, Lindstrom JM, Seybold ME. Experimental autoimmune myasthenia: A model of myasthenia gravis in rats and guinea pigs. *J Exp Med* 1975;141(6):1365–1375.

Li H, Zhang YY, Sun YN, Huang XY, Jia YF, Li D. Induction of systemic lupus erythematosus syndrome in BALB/c mice by immunization with active chromatin. *Acta Pharmacol Sin*. 2004; 25(6):807-11.

Marcin F. Osuchowski, James Teener, Daniel Remick, Noninvasive model of sciatic nerve conduction in healthy and septic mice: reliability and normative data. *Muscle Nerve*. 2009; 40(4): 610–616. doi: 10.1002/mus.21284

Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. *Prog Neurobiol*. 2010; 92(3):386-404.

Osuchowski Mf, Teener J, Remick D. Noninvasive model of sciatic nerve conduction in healthy and septic mice: reliability and normative data. *Muscle & nerve*. 2009; 40(4):610-616.

Planaguma, J.; Leypoldt, F.; Mannara, F.; Gutierrez-Cuesta, J.; Martin-Garcia, E.; Aguilar, E.; Titulaer, M.J.; Petit-

Pedrol, M.; Jain, A.; Balice-Gordon, R.; et al. Human N-methyl-d-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain J. Neurol.* 2015, 138, 94–109.

Powell SB1, Zhou X, Geyer MA. Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia. *Behav Brain Res.* 2009 Dec 7;204(2):282-94. doi: 10.1016/j.bbr.2009.04.021.

Richard M Ransohoff. Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nature Neuroscience.* 2012; 15: 1074–1077. doi:10.1038/nn.3168

Robert M.J. Deacon , Measuring Motor Coordination in Mice. *J Vis Exp.* 2013; (75): 2609. doi: 10.3791/2609

Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology.* 2004; 29 (11): 2007-17.

Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols.* 2006;1(2):848-858.

Xie C, Sun J, Qiao W, Lu D, Wei L, Na M, Song Y, Hou X, Lin Z. Administration of simvastatin after kainic acid-induced status epilepticus restrains chronic temporal lobe epilepsy. *PLoS One.* 2011;6(9):e24966. doi: 10.1371/journal.pone.0024966.

Yang M, Crawley JN. Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N Crawley . [et al].* 2009;CHAPTER:Unit-8.24.

Zutphen L. F. M. Van, Baumans V., Beynen A. C.. Recognition of pain and distress .*Principles of Laboratory Animal Science, Revised Edition, 1st Edition, 2001.*

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be sacrificed at the end of the experiment.

The sacrifice of the animals will be done according to the analysis requirements, in this case, based on the tissue characteristics. If fixed tissues have to be studied, perfusion is necessary to preserve the organ/tissue in an optimal way.

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

- 1) This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- 2) A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- 3) For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 4) 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 |
|---------------|---------------------------------|
| 3 | Passive immunization in rodents |

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 development of passive immunization rodent models for autoimmune mediated diseases that target antigens in the nervous system.

[Redacted content]

- [Redacted content]
- [Redacted content]
- [Redacted content]
- [Redacted content]

- [REDACTED]
- [REDACTED]

[REDACTED]

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

The primary outcome is the generation of autoimmune models of the nervous system to study the pathogenic mechanisms of the autoimmune disorders affecting the nervous system. The measures will include behavioral (symptomatic), neurological and locomotor tests, followed by post mortem analysis to describe the pathogenic mechanisms of the autoimmune diseases.

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

The immunization varies on the animal model as described above. The frequency is also determined by several parameters like the immunogenicity and stability of the antibodies, the severity of the induced disease, etc. with a minimum of a unique immunization at the beginning to a constant perfusion of the antibody until the end of the experiment. For peripheral injections, i.p. injections are the most common ones unless the antibody target is highly expressed in the peritoneal cavity, being then i.v. administration the optimal. For intrathecal injection, a constant intra-ventricular infusion via a minipump is optimally used. In shorter experiments (<1 week) only one or two intra-ventricular injections would be considered. In case the antibody has to reach the CNS and the injection is peripheral, BBB permeabilization reagents will be used, together with the antibodies, as described above. The immunization site will be checked the days after the intervention to be sure complications will not appear.

Control groups are required in all experiments. We will include a control without the disease (a non-pathogenic antibody is going to be injected instead of the pathogenic antibodies). The control group will be treated equally as the study group, meaning that permeabilize reagents will be also injected to control group if required. In case the study is based on the capacity of the antibody to penetrate the BBB, the study group is composed by 2 groups (antibody with and without the permeabilization), 2 control groups will be required (antibody without permeabilization and permeabilization without antibody).

The motor, neurologic and behavioral battery set up will depend on the nature of the disorders. Also, from each animal model, the batch of tests will be selected to answer the questions as accurately as possible. Every antibody will induce a specific group of symptoms. Some examples of which we expect to study with the associated symptoms are depicted in the table below.

Table 1. [REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

Animal procedures selected will depend on the purpose of the study as mentioned before. All possible tests have been mentioned in the Table 2 (below). The combination of the tests selected disease specific is defined according to the pathology and the research question. All the choices about the test that we will perform will be based on the latest literature for each pathology reported (Table 1) and on the availability of the tests in our department. It is important to mention that not all the animals in the same experiment will follow the same set of tests, since some of them are incompatible. Some tests have to be performed regularly as described in the Table Y and others just once, where some others are terminal experiments.

Table 2. Procedures required characterizing neuropsychiatric animal models. Tests are classified according to the main outcome and the character of it: behavior, neurologic and locomotion. A brief description per test and the degree of invasiveness and discomfort has been included.

Procedure/test	Description	Main outcome	Example	Invasive/ non invasive// discomfort	Behavior/ neurologic/ locomotion/ operational
1. Alternating Y-maze (Hughes RN., 2004)	The animal is introduced in the center of a Y-shaped maze with three white opaque arms. The number of arm entries and the percent of alternations are calculated.	Willingness to explore new environments. Cognitive working memory.	Individuals with cognitive deficits perform less alternation compared to wild type (WT) animals due to the deficit in cognitive working memory.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (cognition)
2. Black and white test box (Costall B. et al., 1989)	The animal is introduced into a box with bright and dark areas. The preference light/dark areas are measured.	Anxiety and exploratory behavior.	The preference by dark areas can be silenced by anxiolytic drugs.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect)
3. Catwalk (Deacon R.M.J., 2013)	The animal traverses a glass plate voluntarily and the footprints are recorded.	Locomotor activity and nociception.	Minimal physical interference and pain behaviors can be detected and analyzed (different patterns) by this method. Analgesic efficiency can be evaluated.	Non invasive // Mild discomfort	Locomotion

4. Cued and Contextual Fear Conditioning (Curzon P. et al., 2009)	The animal is placed in a box where different expected/unexpected stimulus (light, tone, odor) will be presented. The animal will freeze when an unexpected stimulus is presented. The percentage spent freezing and time for extinction will be measured.	Associative learning and memory (amygdala-hippocampus dependent).	Rodent models with cognitive deficits show less freezing during both cued and context freezing after having been conditioned. Furthermore, they show faster extinction of conditioning compared to WT animals.	Non invasive // Moderate discomfort	Behavior (cognition)
5. Electromyography (EMG) (Osuchowski M.F., et al., 2009)	Different electrodes are located in the paw and in the tail. The time required to transport the electric signal is recorded.	Skeletal muscle electric activity.	In MG rats, EMG is useful to record the degeneration of the muscles and the progression disease.	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia, terminal experiment)	Neurologic
6. Elevated zero maze test (Kulkarni SK. et al., 2007)	Animals are displaced in an annular or "X" shape elevated platform with open and enclosed quadrants. The time spent in enclosed areas is measured.	Anxiety.	In rodent with cognitive deficits, spent less time in the enclosed arms compared to WT animals, indicating memory deficits.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect)
7. Encephalography (EEG) (Xie C. et al., 2011)	Brain spontaneous activity is measured and recorded from multiple electrodes placed on the scalp. A video recording is necessary to confirm epileptic seizures.	Electrical brain activity and epileptic seizures.	Epileptic events and encephalopathies can be diagnosed by this method in animal models.	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia)	Neurologic
8. Forced swimming tests (Can A. et al., 2012)	The animal is placed in a cylindrical tank with water (the bottom is not reachable and they can not scape from the container). The time spent trying to escape/swim/float is recorded.	Anhedonia, depressive-like behavior	Anti-depressant therapies can be tested using this technique.	Non invasive // Moderate discomfort (anxiety and stress)	Behavior (affect)
9. Horizontal and fixed bars (Deacon RMJ. 2013)	The animal is placed in the middle of a horizontal suspended bar (with different diameters) where they need to walk without falling. In the fixed bars, the different diameters bars are fixed and they need to go from one end of the stick to the base.	Motor function, orientation and coordination	The animal get a composite score: time spent on the bar without falling, capacity to reach the base of the apparatus and the diameter of the bar. Animals with neurological or locomotor issues will have difficulties and fall soon.	Non invasive // Mild discomfort	Locomotion and neurologic
10. Intubation	Artificial ventilation is	Ensure breathing	Electromyography is a	Invasive //	Operational

██████. et al., 2015)	provided to the animal through a trachea incision, placing a tube connecting to air flow.		procedure where curare is injected, blocking all muscles making artificial ventilation necessary.	Mild discomfort (under anesthesia, terminal experiment)	
11. Morris Water Maze (Vorhees CV. and Williams MT., 2008)	The rodent is placed in a swimming arena where a submerged platform is located in a strategic place. The time spent to learn will determine the spatial learning and later on the time spent to find the platform will be correlated with the reference memory (the arena is divided by 4 quadrants).	Spatial learning and memory hippocampus dependent. Swimming skills	Rodents with cognitive deficits will spend less time in the target quadrant, because they forgot where it was. The swimming speed can also be measured to determine the locomotion status.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (cognition) and locomotion
12. Nerve conduction speed (NCS) (Osuchowski M. et al., 2009; ████████ et al., 2015)	Electrodes are placed in the leg and on the tail of the animal. The time required to receive the stimulus from the emitting and the receiving is recorded and correlated with the nervous and muscle status	Nerve damage and neuropathic measurement	Nerve damage can be measured using this technique for example for sciatic nerve impairment. Neuropathy can be tested also as a drug side effect using this technique	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia)	Neurologic
13. Object recognition task (Leger M. et al., 2013)	Two similar objects are presented to the animal for the first time and the second time one of them is replaced by a new object. Object exploration duration and habituation times can be analyzed.	Cognition and recognition memory	Animals with cognition impairment will spend more time to recognize the constant and the new object.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (cognition)
14. Olfactory function /Smell threshold concentration test (Yang M. et al., 2009; Katzay A. et al., 2014)	Animals are exposed to increasing concentrations of menthol diluted in mineral oil and the minimal menthol concentration that the mouse responds to is recorded. A mouse response is considered positive when it displays a sharp aversive movement away from the source of smell.	Olfactory function and depression like-behavior	A depressive like behavior is related to decreased olfactory function, so animals with depression will need a stronger olfactory stimulus for positive reaction	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (affect)
15. Open Field Test (Bailey KR. And Crawley JN., 2009)	The animal is placed in a square chamber, divided in areas. A recording system will determine the	Locomotion, emotional and anxiety.	Rodent models with cognitive deficits or treated with anxiolytic drugs will show	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect) and locomotion

	preference of the animal between the periphery and the central areas. In parallel, distance and speed, rare behaviors, grooming, etc. can be evaluated.		reduced time spent in corners due to reduced anxiety.		
16. Parallel rod floor test (Kamens HM and Crabbe JC., 2007)	The animal is placed in a parallel stainless steel rod with a base plate behind. The animal paws are recorded and the number of times they slip through the parallel metal rods and touches the base plate.	Motor coordination (ataxia) and activity.	In rodent with cognitive deficits, locomotion deficits have been observed.	Non invasive // Mild discomfort	Locomotion
17. Perfusion [redacted] et al., 2010; [redacted] et al., 2015)	The animal is injected in the central venous system with a reagent (PBS or a fixative)/ The liquid is injected in the left atrium and a cut in the right ventricle drain the liquid.	Remove blood and/or preserve the tissue and organs.	Muscles in MG animal models have to be analyzed ab for this, fixed material is necessary because it help to maintain the integrity of the proteins. Brain is another important organ where sometimes the blood has to be removed or the tissue has to be fixed.	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia, terminal experiment)	Operational
18. Pre-pulse inhibition (PPI) (Powel SB et al., 2009)	The animal receives a weak prestimulus o prepulse that results in the inhibition of the reaction of the animal after a subsequent strong startling stimulus or pulse (usually acoustic or light stimulus).	Anhedonia, depressive-like behavior	PPI has been used primarily in pharmacological animal models to screen putative antipsychotic medications. It is considered to be one of the most promising neurophysiological indexes for translational research in psychiatry (Hidetoshi T et al., 2011).	Non invasive // Mild discomfort	Behaviour (affect)
19. Rack grabbing test ([redacted] et al., 2010; [redacted] et al., 2015)	The animal is held by the tail and a 300g metal rack has to be grabbed repeatedly (5 times with a resting interval of 30s aprox.).	Strength, weakness and fatigability. Depressive-like behaviors.	MG animal models or other muscle impaired models can be graded using this method by the number of repetitions and the time they grab the rack.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Locomotion, Behavior (affect)
20. Resident-intruder tests	The animal is placed in a box, first with a sterile	Social interaction, stress and	The social and communication skills	Non invasive // Mild	Behavior (affect) and locomotion

(Koolhaas JM. et al., 2013)	female and later with a male from a non-aggressive strain. Social interaction and stereotypical aggressive behaviors are recorded and later analyzed by the frequency of these activities.	aggressiveness/violence.	and the locomotion can be measured in transgenic mice, where the animals presented more violence. Also the drug effect can be studied in terms of clarity and aggressiveness.	discomfort (anxiety)	
21. Rotarod (Deacon RMJ. 2013)	The animal is placed in a horizontal cylinder (delimited on the sides). The cylinder rotate at different increasing speeds and the animal have to walk without falling.	Motor function and coordination	The animal get a composite score: ledge test, hind limb clasping, gait, kyphosis (locomotion) and time spent. Animals with neurological or locomotor issues will have difficulties and fall soon.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Locomotion and neurologic
22. Social interaction test (Kaidanovich-Bejilin O. et al., 2011; Sato A. et al., 2013)	The animal is placed in a 3 chamber cage. After habituation, the preference between an empty/known animal/unknown animal is measured. The activity is recorded and number and time spend in each department counted.	Natural sociability and preference novel sociability.	Many neuropsychiatric disorders are characterized by social behavior and recognition disruption. Other locomotion and cognitive parameters can be recorded.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior and locomotion (affect)
23. Spatial Y-maze, X-maze and V-maze spontaneous alternation test (Lainiola M. et al., 2014)	The animal is placed in the connection of a 3 arm maze and the exploring capacity is measured by the number of arm entries/alternation. Different objects can be placed at the end of the arms.	Cognitive deficits, memory, anxiety	Transgenic animals or drug effect can be analyzed in the cognitive level using this method, measuring the willingness of rodents to explore new environments. Memory deficits can be measured also by the time spent to recognize the objects.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect/cognition)
24. Sucrose preference/anhedonia test (Strekalova T. et al., 2004)	The rodent is free to choose between a water/sucrose solutions. The % of preference sucrose/liquid consumed is used as criteria (threshold 65%).	Anhedonia and depression-like behaviors	In chronic stress animal model, depression like behavior shows the acuteness of the model with a reduction of sucrose consumption.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (affect)
25. Tail suspension test (██████████. et al., 2010; ██████████ et al., 2015)	The animal is held by the tail and they need to climb on the top of the hand repeatedly (5 times	Strength, weakness, fatigability. Stress and depressive-	In MG rats, this is a parameter used to observe the acuteness of the disease.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Locomotion and behavior (affect)

	with a resting interval of 30s approx.).	like behaviors.	Animals exposed to tail suspension for longer periods daily develop chronic stress.		
26. Venipuncture	A needle is used to puncture an occluded vessel (saphenous vein or submandibular venous sinus). The blood start dripping and after collecting the required amount, you have to press the area to stop the bleeding.	Obtaining a blood sample.	Blood contains a lot of parameters that can be studied in order to monitor autoimmune state in animal disease models like MG, encephalitis, etc. Drug side effects can also be assessed by blood analysis.	Invasive // Mild discomfort	Operational
27. Von Frey and Hargraves (Krzyzanowska A. And Avedaño C., 2012)	The animal is subjected to different thermic and mechanic increasing intensity stimulus. The maximum intensity the animal can withstand without reaction is recorded as a threshold.	Pain susceptibility/ nociception.	Animal models can be tested by this method to assess the susceptibility to pain which reflect their own welfare. Could be an indirect measurement of therapy efficiency or to detect side effects. It also helps to determine the general health.	Non invasive // Moderate discomfort	Behavior (pain)
28. Weight measurement	Animals are placed in a balance and the weight is recorded.	General health.	Weight is a general measurement related with general health, disease progression (for example in MG) and drug side effects.	Non invasive // Mild discomfort	Operational

[REDACTED]

[REDACTED]

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

[REDACTED]

[REDACTED]

Besides the cognition, neurologic and locomotor assessment, some other operational task may be applied to the animal models like general observation (not consider a test/task, since the animals will be checked routinely), venipuncture and weight measurements during the experiment and other terminal tasks like intubation or perfusion at the end of the experiment, depending on the specific purpose of the study.

The experiments will be run for shorter periods than active immunization studies (Appendix 2). For example, the passive immunization in MG is terminated 48-72h after induction (Kusner LL, et al., 2015). For other antigens from the CNS such as for NMDAR encephalitis, animals will be sacrificed 5-46 days after immunization (Planaguma J. et al., 2014) or a neuromyelitis optica (NMO) animal model which is injected with antibodies anti-aquaporin-4, which it takes 14 days (Kinoshita M. et al., 2009). Longer experiments studying the chronic pathological role of the antibody will reach maximum 46 days [REDACTED]. et al., 2016 under revision).

All the tests/procedures applied to the animals are well established procedures under a standard protocol (Standardized operational protocol; SOP) which will reduce the bias of the experiment, since in these cases, interaction between the different tasks are already described and we will not make these specific set of tests for the experimental animals. In case it is necessary to include tasks that will affect each other because of the research question, the groups will be divided in subgroups which will follow different sets of tests. On the other hand, another measure to reduce the bias is the design of the tests performed in each experiment, which will be defined by the literature available currently before the performance of the experiments and also based on the expertise of people who has large experience in the behavior test. Under their advice, the tests will be chosen following a stress increasing scale throughout the experiment (in example, an open field will be always performed before a forced swimming test). It is important to mention that all observers (minimum of 2 independent researchers) will be blinded to different groups when performing the tasks.

For this appendix the go/ no-go criteria are the following:

1. Animal phenotype

- a) Robust and standard: analysis on the different behavior, neurologic and/or locomotion tasks will be performed as well as *in vitro* analysis defining the levels of different markers involved in autoimmunity like autoantibodies (specific and unspecific), inflammation cells and molecules e.g. plasma cells and cytokines. For standard animal models, the non-reproduction of the symptomatology and other markers is a direct no-go criteria, taking into account the variance between experiments. For novel animal models, if no differences equal or higher than 10% between the disease and the control group are found, a no-go decision will be followed. In this case, the experimental conditions of the model will be studied in detail and changes (e.g. species, gender, route of administration, frequency, dose, adjuvants, etc.) will be implemented to try to generate a robust and standard animal model. If no differences are found after modifying the strategy, we will report the results as a non-successful OR NON-VIABLE model for the specific antigen of interest.
- b) Severe: the symptomatology of the animal model will be observed and in case of severe discomfort and/or pain, because of the intervention procedures (e.g. immunization), analgesic will be applied and if even using this the animal keep suffering, a no-go decision will be followed and as explained in point a), some changes will be implemented.

2. Test battery

After the analysis of the results of the battery tests, a go/no go decision will be followed. In case an animal model shows differences in one of the domains and not in the other, the number of tasks assessing this parameter will be increased and the other test removed from the batch. Moreover, some tests included in Table 2 will be performed in case a strange behavior is observed during routine observation. It is important to mention that, the behavioral battery may change based on results generated from the first groups tested (based on a go/no-go decision after a first characterization in case of CNS active immunization models). For example:

- a) When the animal model is new, a characterization of the results in each test will provide an overview of the effect of each antigen specific immunization in the animal model, so a go decision will be followed in this case up to enough reliable data is available.
- b) In case of new animal models when a test has been shown (see previous point a)) not to detect differences between groups using a positive and a negative control, it will be discarded from the behavioral battery for this specific animal model (this indicates that the test for that particular model is not useful (no go decision)).
- c) When the animal model is well characterized and the results from the test are unexpected, showing no differences between the groups, a no-go decision will be followed.

For the postmortem study, CSF and blood will be collected for analysis of different molecule levels (e.g. total immunoglobulin levels and specific isotypes and antigen specific immunoglobulin or other factors affected) and cell populations will be studied as well to see how different immune system related cells and molecules can vary due to the disease. On the other hand, tissues will be collected to be analyzed. Immune related organs – thymus, spleen, lymph nodes, bone marrow –, brain, muscles and other organs which can be affected specifically by the disease developed – intestines, gut, sciatic nerve, liver, kidney, etc.-. For tissue collection, based on the research question to be answered, different treatments can be applied to the tissue, being necessary to include in some experiments perfusion with different reagents (glutaraldehyde, paraformaldehyde, etc.) of the animals to obtain fixed tissue (e.g. for MG, 2% glutaraldehyde perfused muscles are necessary to study the neuromuscular junction structure). The techniques we are going to use during this study are: cell based assay (CBA), immunohistochemistry (IHQ), immunofluorescent (IF), radioimmunoassay (RIA), ELISA, Western blot/Dot blot, Flow cytometry, polymerase chain reaction (PCR), electron microscopy can be used and are already operational in our group, based on the literature.

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

The numbers of animals will be kept to a minimum by collaboration with people who have extensive experience in the generation of autoimmune animal models.

The research strategy will be based on the use of the most informative and descriptive test set for each disease model under the advice of experts in the field, own experience and the use of the literature. We will try to include as many tests as possible taking always into account the bias error and also we will avoid superfluous repetitions. As mentioned above, go/no-go decisions will be taken according to the pathology. If no differences are found using a test already reported to show significant differences, the experiment will be halted. In case there is no previous report about the test, the experiment will continue as a characterization (see above paragraph test battery).

We will use the effect size as a quantitative measurement of the strength of the phenotype of the animal model. Taking into account the next assumptions: a very large-huge effect size ($d=1.20-1.40$; Sawilowsky, S. Journal of Modern Applied Statistical Methods, 2009) and a power of 0.80 (Cohen J., Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences, 1988), with an $\alpha=0.05$ for two-tailed and $\alpha=0.025$ for one tailed, we will need 9-12 animals per group.

As parameters we will use, in active immunization animal models: IgG titers and weight measurements with some phenotype characteristics (in case of CNS, all the tests proposed in the 5 domains that we will perform in the first pilot) to see whether there are differences or not between the animal model and the controls.

In case of passive transfer animal models, weight measurements and the outcome of the tests performed

to cover the 5 domains will be taking into account.

B. The animals

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

For this experiment, rodents, including mice and rats will be used. Different species, strain, and genetic background (also WT) animals can be included. The specie (3), strain based on the genetic background, gender (2) and age range will be adjusted according to the literature to the most suitable. According to the induced nervous system autoimmune pathology, the onset severity and progression of the disease can vary and also the extension of the model.

It is intended to use wild type animals (with or without LPS/encephalitogenic T-cells injection to permeabilize the BBB), models with and without an impaired BBB (i.e. ApoE^{-/-}) for brain targets and human transgenic models (i.e. epsilon or gamma AChR subunits (AChR ϵ , AChR γ)) for the protein of interest to mimic the human pathology.

Based on previous literature for NDMAR encephalitis model; wild type C57Bl/6 can be used to mimic memory deficits, and anhedonic and depressive-like behaviors but not locomotor or epileptic phenotypes (Planaguma L. et al., 2014).

We have already experience with the MG model using female Lewis rats aged 10-12 weeks, which is suitable to distinguish the clinical characteristics. C57Bl/6J mice are recommended to study regulatory functions (Kusner LL. et al., 2015).

In general, we will use adult animals for experiments. However, it is known that many factors from the mother can affect the fetus. Antibodies are an example of these molecules that can cross the placental membrane and affect the fetus, even when the mother does not have symptoms, since the antibodies can target only fetal antigens, such as AChR γ . This has been investigated in autism spectrum disorder, where the mothers from autistic children showed a specific band against fetal brain but not against adult brain, meaning that the autoantibodies transferred by the mothers can recognize the fetal proteins, affecting the child. However, this bands were not found in those mothers with normal children, showing the specificity (Braunschweig D. et al., 2008). This can be also the case of other neuropsychiatric disorders like schizophrenia or bipolar disorder, among others. Because of this, we would like to include pregnant animals to study placenta transfer of antibodies and effects of those antibodies on the offspring viability and on the fetus/neonate.

For the animal models of passive immunization we will generate a maximum of 8 animal models (defined by the time period of 5 years). An estimated distribution can be: 2 animal studies for MG (PTMG), 5 CNS autoantibody studies and 1 model generated with autoantibodies generated *in vivo* (Appendix 1) but since the source of the autoantibodies is mainly from patients, is completely dependent on this. For these studies we will need about 30 animals per group (passive transfer autoimmune models are more robust since autoantibodies are directly administrated to the animal) and the same amounts of control animals. When studying the role of the BBB, there will be 4 study groups consisting of:

1. Disrupted BBB – pathogenic immunoglobulin
2. Disrupted BBB – nonpathogenic immunoglobulin
3. Non disrupted BBB (wild type) – pathogenic immunoglobulin
4. Non disrupted BBB (wild type) – nonpathogenic immunoglobulin

For the development of all animal models, using a maximum of 8 antigens, this will be a total maximum of 960 animals (30*4*8=960). Likely, we will be able to reduce these numbers by testing different autoantibody targets at the same time. For example, we expect to study AMPAR, GABA_B and NMDAR (common outcome parameters) which could all be injected in parallel and thereby we would only need one control group for the 3 antigens. Also, some control group can be saved in case we want to compare the incidence of the BBB disrupted models in the pathology, since the non disrupted groups can be shared in this case.

In this calculation we have already taken into account that some animals will have the same conditions but will be sacrificed in different way according to the tissue analysis requirement and the high variability existent in passive immunization models.

Summarizing, a total of 960 animals (600 rats and 360 mice) will be included in the "Passive immunization in rodents" appendix.

All animals will be obtained from a registered supplier or a researcher who have specific animal models in case the registered supplier doesn't have it.

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.

Animal models of autoimmune diseases are required to study the *in vivo* pathogenic mechanisms, which will help to understand the procedures underlying the disease. Autoantibodies from a specific patient can be individually studied, increasing the personification of the pathogenic tracks in each patient and prove that the autoantibodies are the cause of the pathology, which is difficult to measure in lower organisms. Increasing the knowledge in this area will help the clinicians to apply more efficient treatments to the patients and to test these drugs, also *in vivo* experiments using the disease model are required. There are no other *in vitro* experimental approaches that can give us this information.

The number of animals will be keep to the minimum that can give statistical differences by combining different autoantibodies with similar outcomes and sharing the control groups as explained above. By doing power calculations for sample size and implementing go/no-go criteria we further limit the amount of animals used.

Refinement will take place by using anaesthesia and analgesia for the invasive procedures.

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

We are going to adapt the accommodation and the care to the need of the animals. To limit animal discomfort; anaesthesia and analgesia will be used to reduce the discomfort of the animals during the invasive procedures, like nerve conductance or for the terminal experiments like electromyography using curare where the animals have to be intubated (for more details see Table 1). Animals which are going to follow pain susceptibility test could not be under anesthesia (will not have anesthesia during a certain period before the test is performing (usually pain tests are run in the middle of the experiment, time enough after the immunization and before the terminal experiments, so the anesthesia is not interfere in any case). Because of this, if some animal present high discomfort, the subject will be withdrawn (in any case, this is not what we expect, since these specific tests are performed in chronic models and the humane endpoints are always took into account).

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

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.

Animals will be monitored daily. Anaesthetics and analgesics will be used to reduce the pain and discomfort of the animals due to some procedures (intra ventricular injection, NCS and EMG). Pain tests are going to be run during the experiment as a part of the model characterization or drug side effects and can be also used as a welfare measurement. No analgesics or anaesthetics will be used in normal procedures like blood extraction or neurological, motor or behaviour assesment/tests.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

We can expect adverse effect of the immunization (infections in case of constant infusion through a pump, inflammation in the immunization site, immune system hyperactivity) and the induced disease *per se* due to the pathogenic mechanisms developed (the characteristics symptoms from each disease, i.e. weakness and fatigability in MG and stress, cognitive impairment and seizures in CNS models). Other aspects compromising the welfare of the animals is the *i.p.* injection, which increases the risk of peritonitis and serous fluid production.

There are no adverse effects are expected in relation to the venipuncture or the NCS, neither in the behaviour nor in pain susceptibility tests.

Explain why these effects may emerge.

An unwanted effect could be observed because of immune reaction against the antigen and the permeabilizing agent. The animal will undergo inflammation in the area of injection with possible pain. Pain killers will be administered if necessary. Furthermore, systemic inflammation might occur if the

antibodies start reacting with unspecific endogenous proteins. Many of these antigens have never been used in rodent models and we cannot know how symptoms differ from the human condition.

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

The severity of the induced pathology fluctuates since acute illness can be induced depending on the dose, frequency and duration of the immunization. [REDACTED]

[REDACTED]

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.

Humane endpoints will be applied in case of rapid weight loss (>20% within 3 days without any improvement), severe acute inflammation at the immunization point (untreatable by the definition of the veterinarian). The following endpoints are unlikely for completeness we include them since some phenotypes have never been tested before. These includes prolonged diarrhea (>3 days), coughing, self-induced trauma, icterus and severe ulceration or bleeding (Recognition of pain and distress, Principles of Laboratory Animal Science, 2001).

We expect neurological symptoms related with autoimmune models where the CNS is target. The incapability to perform the behaviour tasks, the inability to eat and drink (recognized by dehydration signs, weight loss and general body condition) or the presence of continuous tremors, status epilepticus or circling (symptoms from what the animal will not recover) are non expected symptoms that, in case of occur, will be taken as a humane endpoint and the animal will be sacrificed.

In case of generalized unexpected severe adverse reaction the experiment will be halted.

Indicate the likely incidence.

The severity of the induced pathology fluctuates since acute illness can be induced depending on the dose, frequency and duration of the immunization. All animals will be sacrificed when the disease is more acute, "full blown" to study the pathological mechanisms in a severe situation, which are usually time short time periods. An example of MG passive model, where in an experiment silencing an associated protein to the neuromuscular junction by [REDACTED] et al., no animal had to be sacrificed before the end of the experiment (max. 72h after immunization). However, an example of the CNS is the work run by Planaguma and colleagues, where the animals had a constant i.v. infusion to reproduce a chronic psychiatric disorder, any of them reach the human endpoints before the end of the experiment (max. 42 days).

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').

All the animals will experience some degree of discomfort. The intermediate analysis of the behavioral, neurologic and/or locomotion tests cause mild to moderate discomfort. Operational procedures generate mild discomfort in 100% cases, however, immunization evokes moderate discomfort. Since all the animals will undergo immunization (except the control group for pain tests), the added discomfort of all tasks is moderate.

References:

Agnieszka Krzyzanowska and Carlos Avendaño. Behavioral testing in rodent models of orofacial neuropathic and

inflammatory pain. *Brain Behav.* 2012; 2(5): 678–697. doi: 10.1002/brb3.85

Atsushi Sato, Masashi Mizuguchi, Kazutaka Ikeda. Social interaction test: a sensitive method for examining autism-related behavioral deficits. *Protocol exchange | Community contributed.* 2013: doi:10.1038/protex.2013.046

Bailey KR, Crawley JN. Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5221/>

Bradl, M., Misu, T., Takahashi, T., Watanabe, M., Mader, S., Reindl, M., Lassmann, H. Neuromyelitis optica: Pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Annals of Neurology.* 2009; 66(5), 630–643.

Braunschweig D, Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Croen LA, Pessah IN, Van de Water J. Autism: maternally derived antibodies specific for fetal brain proteins. *Neurotoxicology.* 2008 Mar;29(2):226-31.

Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD. The Mouse Forced Swim Test. *Journal of Visualized Experiments : JoVE.* 2012;(59):3638. doi:10.3791/3638.

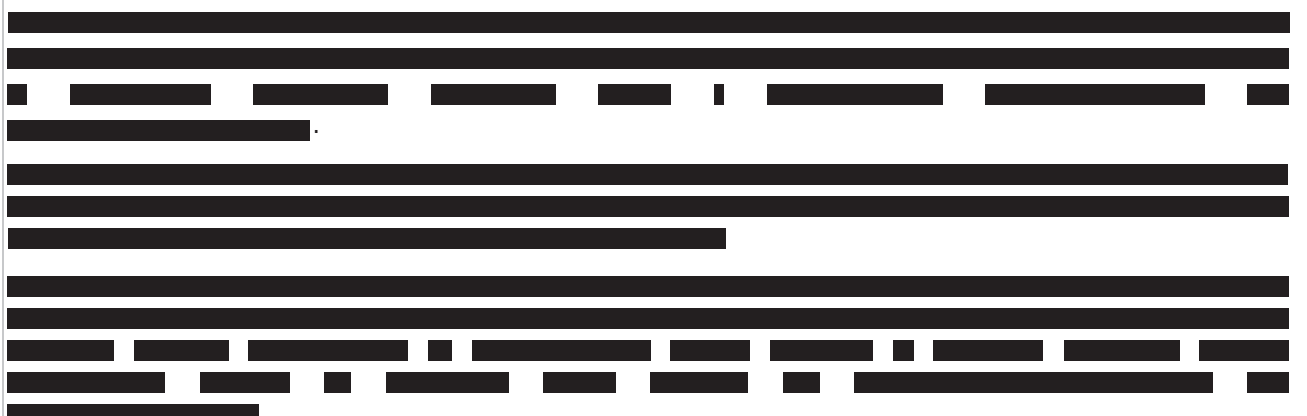
Chang, E. H., Volpe, B. T., Mackay, M., Aranow, C., Watson, P., Kowal, C., ... Diamond, B.. Selective Impairment of Spatial Cognition Caused by Autoantibodies to the N-Methyl-d-Aspartate Receptor. *EBioMedicine.* 2015; 2(7), 755–764

Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989; 32(3):777-85.

Curzon P, Rustay NR, Browman KE. Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5223/>

Deacon RMJ. Measuring Motor Coordination in Mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE.* 2013;(75):2609. doi:10.3791/2609.

Denic A., Johnson AJ, Bieber AJ., Warrington AE., Rodriguez M., and Pirko I.. The Relevance of Animal Models in Multiple Sclerosis Research. *Pathophysiology.* 2011; 18(1): 10.



Hidetoshi Takahashi, Ryota Hashimoto, Masao Iwase, Ryouhei Ishii, Yoko Kamio, and Masatoshi Takeda. Prepulse Inhibition of Startle Response: Recent Advances in Human Studies of Psychiatric Disease *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2011 Dec; 9(3): 102–110. doi: 10.9758/cpn.2011.9.3.102

Hughes RN, The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. 2004; 28(5):497-505.

Jones MV., Collongues N., de Seze J., Kinoshita M., Nakatsuji Y., Levy M. Review of Animal Models of Neuromyelitis Optica. *Mult Scler Relat Disord.* 2012; 1(4): 174–179.

Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR. Assessment of Social Interaction Behaviors. *Journal of Visualized Experiments : JoVE.* 2011;(48):2473. doi:10.3791/2473.

Kamens HM, Crabbe JC. The parallel rod floor test: a measure of ataxia in mice. *Nature protocols* 2007;2(2):277-81. doi:10.1038/nprot.2007.19

Katzav A, Ben-Ziv T, Blank M, Pick CG, Shoenfeld Y, Chapman J. Antibody-specific behavioral effects: Intracerebroventricular injection of antiphospholipid antibodies induces hyperactive behavior while anti-ribosomal-P antibodies induces depression and smell deficits in mice. *Journal of Neuroimmunology*, 2014: 272(1-2), 10–15.

Kinoshita M, Nakatsuji Y, Kimura T, Moriya M, Takata K, Okuno T, Kumanogoh A, Kajiyama K, Yoshikawa H, Sakoda S. Neuromyelitis optica: Passive transfer to rats by human immunoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 4;386(4):623-7.

Kirkwood, James and Hubrecht, Robert. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*. Wiley-Blackwell, 2010. p. 29. ISBN 1-4051-7523-0.

Koolhaas JM, Coppens CM, de Boer SF, Buwalda B, Meerlo P, Timmermans PJA. The Resident-intruder Paradigm: A Standardized Test for Aggression, Violence and Social Stress. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 2013;(77):4367. doi:10.3791/4367.

Kulkarni SK1, Singh K, Bishnoi M. Elevated zero maze: a paradigm to evaluate antianxiety effects of drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2007;29(5):343-8.

Lainioli M, Procaccini C, Linden AM. mGluR3 knockout mice show a working memory defect and an enhanced response to MK-801 in the T- and Y-maze cognitive tests. *Behav Brain Res*. 2014: 1 (266) 94-103. doi: 10.1016/j.bbr.2014.03.008.

Leger M, Quideville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P. Object recognition test in mice. *Nature Protocols*. 2013; (8) 2531–2537. doi:10.1038/nprot.2013.155

Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. *Prog Neurobiol*. 2010; 92(3):386-404.

Osuchowski Mf, Teener J, Remick D. Noninvasive model of sciatic nerve conduction in healthy and septic mice: reliability and normative data. *Muscle & nerve*. 2009; 40(4):610-616. doi:10.1002/mus.21284.

Planaguma, J.; Leypoldt, F.; Mannara, F.; Gutierrez-Cuesta, J.; Martin-Garcia, E.; Aguilar, E.; Titulaer, M.J.; Petit-Pedrol, M.; Jain, A.; Balice-Gordon, R.; et al. Human N-methyl-d-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain J. Neurol*. 2015, 138, 94–109.

Powell SB1, Zhou X, Geyer MA. Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia. *Behav Brain Res*. 2009 Dec 7;204(2):282-94. doi: 10.1016/j.bbr.2009.04.021.

Robert M.J. Deacon , Measuring Motor Coordination in Mice. *J Vis Exp*. 2013; (75): 2609. doi: 10.3791/2609

Sommer, C., Weishaupt, A., Brinkhoff, J., Biko, L., Wessig, C., Gold, R., & Toyka, K. V.. Paraneoplastic stiff-person syndrome: Passive transfer to rats by means of IgG antibodies to amphiphysin. *Lancet*. 2005; 365(9468), 1406–1411.

Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology*. 2004; 29 (11): 2007-17.

Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols*. 2006;1(2):848-858. doi:10.1038/nprot.2006.116.

Xie C, Sun J, Qiao W, Lu D, Wei L, Na M, Song Y, Hou X, Lin Z. Administration of simvastatin after kainic acid-induced

status epilepticus restrains chronic temporal lobepilepsy. PLoS One. 2011;6(9):e24966. doi: 10.1371/journal.pone.0024966.

Yang M, Crawley JN. Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N Crawley . [et al]*. 2009;CHAPTER:Unit-8.24. doi:10.1002/0471142301.ns0824s48.

Zutphen L. F. M. Van, Baumans V., Beynen A. C.. Recognition of pain and distress .Principles of Laboratory Animal Science, Revised Edition, 1st Edition, 2001.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be sacrificed at the end of the experiment if no adverse events happen.

The sacrifice of the animals will be done according to the analysis requirements, in this case, based on the tissue characteristics. If fixed tissues have to be studied, perfusion is necessary to preserve the organ/tissue in an optimal way. Otherwise, normal sacrifice methods (cervical dislocation) will be used.

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'.
- 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 |
|---------------|--|
| 4 | Therapy efficacy and side effect in nervous system autoimmune models |
- 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 application of treatments in a prevention (starting before the disease appears, usually at the same time of the immunization) or therapeutic regimen. The diseases developed are based in nervous system autoimmune disorders, central and peripheral, developed in rodents as described in Appendix 2 and Appendix 3, by active and passive immunization.

The primary outcomes parameters are at two levels: *in vivo* and postmortem analysis.

1. The *in vivo* measures will give information on behavior neurologic and motor status of the animals. The battery of tests used will vary depending on the autoimmune disease model, but the characterization of all the models will be based in behavior (memory, anxiety, etc.), neurologic (electromyography (EMG), nerve conductance speed (NCS)) and locomotion (motor abilities, weakness, fatigue, etc.). This set of tests allows us to better describe the animal status (see brackets in list below).
2. The analysis of the material from the animal models obtained postmortem will be used to assess the biochemical and molecular level of the disease progression and explore the changes after treatment.

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

Therapies modulating the immune system are going to be tested in different nervous system autoimmune disease animal model described in Appendix 1 and 2. Chemical components with autoimmune pathways modulator effect (██████████ et al., 2010), antibodies targeting molecules of the

nervous system (Stevens et al., under preparation), cells playing a role in the mechanisms and genetic material (DNA or RNA) (██████████ al., 2009, ██████████ et al., 2016) changing the mechanism of some molecules, essential in the autoimmune diseases, are some examples of the possible therapies that can be applied in this project.

The administration via (s.c. and i.p. are the most common used and electroporation for genetic material using viral or non-viral vehicles), frequency, concentrations and amount of the drugs will be adjusted to the disease model (chronic or acute) and the drug used, based on the reported literature. In case no previous studies have been reported, different administration via and concentrations will be tested in a pilot study to define the optimal parameters (kinetic and chemodynamic properties of the drug will be taken into account) to have the most effective conditions. The treatment efficacy will be assessed to see whether there is a therapeutic window where the treatment is more effective, depending on the disease developed (acute or chronic) and the therapy agent administrated (e.g. in MG rat developed by active immunization, the therapeutic window goes from 4-8 weeks).

To evaluate the efficacy and the side effects of the drugs for the treatment, behavioral, neurological and locomotor tests will be performed in the animal model groups defined in advance and its controls (animals injected with vehicle like saline) (controls of the animal model are also always included to detect the effect of the drug on healthy animals). The outcomes of these tests in the different groups will allow us to assess whether a drug is effective in halting or improving the clinical symptoms of the pathology studied, and therefore provide a stronger translational potential than just analyzing the effect of the drugs using only outcomes from tissue. The animals will undergo the tests regularly (unless they can only be performed once –e.g. EMG) to have different time point data, where a progression of the pathology and drug effect can be studied. Usually, drug studies are performed in chronic disease models to see the progression of the disorder and the effect of the therapy over time and to characterize and had as much information as possible, regular tests are required, like blood samples (██████████ et al., 2010).

Table 1. Procedures required characterizing neuropsychiatric animal models. Tests are classified according to the main outcome and the character of it: behavior, neurologic and locomotion. A brief description per test and the degree of invasiveness and discomfort has been included.

Procedure/test	Description	Main outcome	Example	Invasive/ non invasive// discomfort	Behavior/ neurologic/ locomotion/ operational
1. Alternating Y-maze (Hughes RN., 2004)	The animal is introduced in the center of a Y-shaped maze with three white opaque arms. The number of arm entries and the percent of alternations are calculated.	Willingness to explore new environments. Cognitive working memory.	Individuals with cognitive deficits perform less alternation compared to wild type (WT) animals due to the deficit in cognitive working memory.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (cognition)
2. Black and white test box (Costall B. et al., 1989)	The animal is introduced into a box with bright and dark areas. The preference light/dark areas are measured.	Anxiety and exploratory behavior.	The preference by dark areas can be silenced by anxiolytic drugs.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect)
3. Catwalk (Deacon R.M.J., 2013)	The animal traverses a glass plate voluntarily and the footprints are recorded.	Locomotor activity and nociception.	Minimal physical interference and pain behaviors can be detected and analyzed (different patterns) by this method. Analgesic efficiency can be evaluated.	Non invasive // Mild discomfort	Locomotion

4. Cued and Contextual Fear Conditioning (Curzon P. et al., 2009)	The animal is placed in a box where different expected/unexpected stimulus (light, tone, odor) will be presented. The animal will freeze when an unexpected stimulus is presented. The percentage spent freezing and time for extinction will be measured.	Associative learning and memory (amygdala-hippocampus dependent).	Rodent models with cognitive deficits show less freezing during both cued and context freezing after having been conditioned. Furthermore, they show faster extinction of conditioning compared to WT animals.	Non invasive // Moderate discomfort	Behavior (cognition)
5. Electromyography (EMG) (Osuchowski M.F., et al., 2009)	Different electrodes are located in the paw and in the tail. The time required to transport the electric signal is recorded.	Skeletal muscle electric activity.	In MG rats, EMG is useful to record the degeneration of the muscles and the progression disease.	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia, terminal experiment)	Neurologic
6. Elevated zero maze test (Kulkarni SK. et al., 2007)	Animals are displaced in an annular or "X" shape elevated platform with open and enclosed quadrants. The time spent in enclosed areas is measured.	Anxiety.	In rodent with cognitive deficits, spent less time in the enclosed arms compared to WT animals, indicating memory deficits.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect)
7. Encephalography (EEG) (Xie C. et al., 2011)	Brain spontaneous activity is measured and recorded from multiple electrodes placed on the scalp. A video recording is necessary to confirm epileptic seizures.	Electrical brain activity and epileptic seizures.	Epileptic events and encephalopathies can be diagnosed by this method in animal models.	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia)	Neurologic
8. Forced swimming tests (Can A. et al., 2012)	The animal is placed in a cylindrical tank with water (the bottom is not reachable and they can not scape from the container). The time spent trying to escape/swim/float is recorded.	Anhedonia, depressive-like behavior	Anti-depressant therapies can be tested using this technique.	Non invasive // Moderate discomfort (anxiety and stress)	Behavior (affect)
9. Horizontal and fixed bars (Deacon RMJ. 2013)	The animal is placed in the middle of a horizontal suspended bar (with different diameters) where they need to walk without falling. In the fixed bars, the different diameters bars are fixed and they need to go from one end of the stick to the base.	Motor function, orientation and coordination	The animal get a composite score: time spent on the bar without falling, capacity to reach the base of the apparatus and the diameter of the bar. Animals with neurological or locomotor issues will have difficulties and fall soon.	Non invasive // Mild discomfort	Locomotion and neurologic
10. Intubation	Artificial ventilation is	Ensure breathing	Electromyography is a	Invasive //	Operational

██████ et al., 2015)	provided to the animal through a trachea incision, placing a tube connecting to air flow.		procedure where curare is injected, blocking all muscles making artificial ventilation necessary.	Mild discomfort (under anesthesia, terminal experiment)	
11. Morris Water Maze (Vorhees CV. and Williams MT., 2008)	The rodent is placed in a swimming arena where a submerged platform is located in a strategic place. The time spent to learn will determine the spatial learning and later on the time spent to find the platform will be correlated with the reference memory (the arena is divided by 4 quadrants).	Spatial learning and memory hippocampus dependent. Swimming skills	Rodents with cognitive deficits will spend less time in the target quadrant, because they forgot where it was. The swimming speed can also be measured to determine the locomotion status.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (cognition) and locomotion
12. Nerve conduction speed (NCS) (Osuchowski M. et al., 2009; ███████ et al., 2015)	Electrodes are placed in the leg and on the tail of the animal. The time required to receive the stimulus from the emitting and the receiving is recorded and correlated with the nervous and muscle status	Nerve damage and neuropathic measurement	Nerve damage can be measured using this technique for example for sciatic nerve impairment. Neuropathy can be tested also as a drug side effect using this technique	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia)	Neurologic
13. Object recognition task (Leger M. et al., 2013)	Two similar objects are presented to the animal for the first time and the second time one of them is replaced by a new object. Object exploration duration and habituation times can be analyzed.	Cognition and recognition memory	Animals with cognition impairment will spend more time to recognize the constant and the new object.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (cognition)
14. Olfactory function /Smell threshold concentration test (Yang M. et al., 2009; Katzay A. et al., 2014)	Animals are exposed to increasing concentrations of menthol diluted in mineral oil and the minimal menthol concentration that the mouse responds to is recorded. A mouse response is considered positive when it displays a sharp aversive movement away from the source of smell.	Olfactory function and depression like-behavior	A depressive like behavior is related to decreased olfactory function, so animals with depression will need a stronger olfactory stimulus for positive reaction	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (affect)
15. Open Field Test (Bailey KR. And Crawley JN., 2009)	The animal is placed in a square chamber, divided in areas. A recording system will determine the	Locomotion, emotional and anxiety.	Rodent models with cognitive deficits or treated with anxiolytic drugs will show	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect) and locomotion

	preference of the animal between the periphery and the central areas. In parallel, distance and speed, rare behaviors, grooming, etc. can be evaluated.		reduced time spent in corners due to reduced anxiety.		
16. Parallel rod floor test (Kamens HM and Crabbe JC., 2007)	The animal is placed in a parallel stainless steel rod with a base plate behind. The animal paws are recoded and the number of times they slip through the parallel metal rods and touches the base plate.	Motor coordination (ataxia) and activity.	In rodent with cognitive deficits, locomotion deficits have been observed.	Non invasive // Mild discomfort	Locomotion
17. Perfusion (██████████ et al., 2010; ██████████ et al., 2015)	The animal is injected in the central venous system with a reagent (PBS or a fixative)/ The liquid is injected in the left atrium and a cut in the right ventricle drain the liquid.	Remove blood and/or preserve the tissue and organs.	Muscles in MG animal models have to be analyzed ab for this, fixed material is necessary because it help to maintain the integrity of the proteins. Brain is another important organ where sometimes the blood has to be removed or the tissue has to be fixed.	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia, terminal experiment)	Operational
18. Pre-pulse inhibition (PPI) (Powel SB et al., 2009)	The animal receives a weak prestimulus o prepulse that results in the inhibition of the reaction of the animal after a subsequent strong startling stimulus or pulse (usually acoustic or light stimulus).	Anhedonia, depressive-like behavior	PPI has been used primarily ██████████ in pharmacological ██████████ animal models to screen ██████████ putative antipsychotic ██████████ medications. It is considered to be one of the most promising neurophysiological indexes ██████████ for translational research in ██████████ psychiatry (Hidetoshi T et al., 2011).	Non invasive // Mild discomfort	Behaviour (affect)
19. Rack grabbing test (██████████ et al., 2010; ██████████ et al., 2015)	The animal is held by the tail and a 300g metal rack has to be grabbed repeatedly (5 times with a resting interval of 30s aprox.).	Strength, weakness and fatigability. Depressive-like behaviors.	MG animal models or other muscle impaired models can be graded using this method by the number of repetitions and the time they grab the rack.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Locomotion, Behavior (affect)
20. Resident-intruder tests	The animal is placed in a box, first with a sterile	Social interaction, stress and	The social and communication skills	Non invasive // Mild	Behavior (affect) and locomotion

(Koolhaas JM. et al., 2013)	female and later with a male from a non-aggressive strain. Social interaction and stereotypical aggressive behaviors are recorded and later analyzed by the frequency of these activities.	aggressiveness/violence.	and the locomotion can be measured in transgenic mice, where the animals presented more violence. Also the drug effect can be studied in terms of clarity and aggressiveness.	discomfort (anxiety)	
21. Rotarod (Deacon RMJ. 2013)	The animal is placed in a horizontal cylinder (delimited on the sides). The cylinder rotate at different increasing speeds and the animal have to walk without falling.	Motor function and coordination	The animal get a composite score: ledge test, hind limb clasping, gait, kyphosis (locomotion) and time spent. Animals with neurological or locomotor issues will have difficulties and fall soon.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Locomotion and neurologic
22. Social interaction test (Kaidanovich-Bejilin O. et al., 2011; Sato A. et al., 2013)	The animal is placed in a 3 chamber cage. After habituation, the preference between an empty/known animal/unknown animal is measured. The activity is recorded and number and time spend in each department counted.	Natural sociability and preference novel sociability.	Many neuropsychiatric disorders are characterized by social behavior and recognition disruption. Other locomotion and cognitive parameters can be recorded.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior and locomotion (affect)
23. Spatial Y-maze, X-maze and V-maze spontaneous alternation test (Lainiola M. et al., 2014)	The animal is placed in the connection of a 3 arm maze and the exploring capacity is measured by the number of arm entries/alternation. Different objects can be placed at the end of the arms.	Cognitive deficits, memory, anxiety	Transgenic animals or drug effect can be analyzed in the cognitive level using this method, measuring the willingness of rodents to explore new environments. Memory deficits can be measured also by the time spent to recognize the objects.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect/cognition)
24. Sucrose preference/anhedonia test (Strekalova T. et al., 2004)	The rodent is free to choose between a water/sucrose solutions. The % of preference sucrose/liquid consumed is used as criteria (threshold 65%).	Anhedonia and depression-like behaviors	In chronic stress animal model, depression like behavior shows the acuteness of the model with a reduction of sucrose consumption.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (affect)
25. Tail suspension test (██████ et al., 2010; ██████ et al., 2015)	The animal is held by the tail and they need to climb on the top of the hand repeatedly (5 times	Strength, weakness, fatigability. Stress and depressive-	In MG rats, this is a parameter used to observe the acuteness of the disease.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Locomotion and behavior (affect)

	with a resting interval of 30s approx.).	like behaviors.	Animals exposed to tail suspension for longer periods daily develop chronic stress.		
26. Venipuncture	A needle is used to puncture an occluded vessel (saphenous vein or submandibular venous sinus). The blood start dripping and after collecting the required amount, you have to press the area to stop the bleeding.	Obtaining a blood sample.	Blood contains a lot of parameters that can be studied in order to monitor autoimmune state in animal disease models like MG, encephalitis, etc. Drug side effects can also be assessed by blood analysis.	Invasive // Mild discomfort	Operational
27. Von Frey and Hargraves (Krzyzanowska A. And Avedaño C., 2012)	The animal is subjected to different thermic and mechanic increasing intensity stimulus. The maximum intensity the animal can withstand without reaction is recorded as a threshold.	Pain susceptibility/nociception.	Animal models can be tested by this method to assess the susceptibility to pain which reflect their own welfare. Could be an indirect measurement of therapy efficiency or to detect side effects. It also helps to determine the general health.	Non invasive // Moderate discomfort	Behavior (pain)
28. Weight measurement	Animals are placed in a balance and the weight is recorded.	General health.	Weight is a general measurement related with general health, disease progression (for example in MG) and drug side effects.	Non invasive // Mild discomfort	Operational

[Redacted text block]

[Redacted text block]

An example of [Redacted text]

- [Redacted bullet point]
- [Redacted bullet point]
- [Redacted bullet point]
- [Redacted bullet point]

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

All the tests/procedures applied to the animals are well established procedures under a standard protocol (Standardized operational protocol; SOP) which will reduce the bias of the experiment, since in these cases, interaction between the different tasks are already described and we will not make these specific set of tests for the experimental animals. In case it is necessary to include tasks that will affect each other because of the research question, the groups will be divided in subgroups which will follow different sets of tests. On the other hand, another measure to reduce the bias is the design of the tests performed in each experiment, which will be defined by the literature available currently before the performance of the experiments and also based on the expertise of people who has large experience in the behavior test. Under their advice, the tests will be chosen following a stress increasing scale throughout the experiment (in example, an open field will be always performed before a forced swimming test). It is important to mention that all observers (minimum of 2 independent researchers) will be blinded to different groups when performing the tasks.

For this appendix the go/ no-go criteria are the following:

- a) Robust and standard: analysis on the different behavior, neurologic and/or locomotion tasks will be performed and *in vitro* analysis as well, definitive the levels of different markers involved in autoimmunity like autoantibodies (specific and unspecific), inflammation molecules and cytokines. For standard animal models, the non-reproducibility of the symptomatology and other markers is a direct no-go criteria, taking into account the variance between experiments. For novel animal models, if no statistically significant differences between the disease and the control group are found, a no-go decision will be followed.
- b) Effectiveness: animals administered with the therapeutic drug has to show an improvement of, at least, 10% when compared with the controls. If this is not the case, a no go decision will be followed. After this decision, modifications in the administration route or the doses will be checked and applied if an improvement is available and check again this point.
- c) Side effects: in case animals administered with the therapeutic drug suffer an increase of discomfort and/or pain compared to the controls (reaching humane endpoints, section J), a no go decision will be followed. After this decision, modifications in the administration route or the doses will be checked and applied if an improvement is available and check again this point.

For the postmortem study, CSF and blood will be collected for analysis of different molecule levels (e.g. total immunoglobulin levels and specific isotopes and antigen specific immunoglobulin or other factors affected) and cell populations will be studied as well to see how different immune system related cells and molecules can vary due to the disease and the therapy administered. On the other hand, tissues will be collected to be analyzed. Immune related organs – thymus, spleen, lymph nodes, bone marrow –, brain, muscles and other organs which can be affected specifically by the disease developed or the therapy applied – intestines, gut, sciatic nerve, liver, kidney, etc.-. For tissue collection, based on the research question to be answered, different treatments can be applied to the tissue, being necessary to include in some experiments perfusion with different reagents (glutaraldehyde, paraformaldehyde, etc.) of the animals to obtain fixed tissue (e.g. for MG, 2% glutaraldehyde perfused muscles are necessary to study the neuromuscular junction structure). If no perfusions are required, cervical dislocation or CO will be the standard methods to sacrifice the animals.

The techniques we are going to use during this study are: cell based assay (CBA), immunohistochemistry (IHQ), immunofluorescent (IF), radioimmunoassay (RIA), ELISA, Western blot/Dot blot, Flow cytometry, polymerase chain reaction (PCR), electron microscopy can be used and are already operational in our group, based on the literature.

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

For the proposed experiment we will make use of a 2-way ANOVA for analysis of behavioral outcomes. Factors for this ANOVA will be phenotype (disease, control), and treatment (saline, prevention, treatment). By making use of a 2-way ANOVA, we can ensure that the minimum number of animals used, will result in maximum power to determine the contribution of the factors involved.

For analysis of plasma and CSF levels of cells/molecules of interest we will make use of a mixed model analysis. The reason for this is that we can account for any missing values due to failure in assays or missing samples from animals. Fixed factors will be the same as those for the behavioral, neurological and locomotor outcomes, as a covariance structure we will choose compound symmetry.

A power analysis will be performed using the software G*Power, which allows to do power analysis for multi-way ANOVA (and also non-parametric criteria/tests: Friedman test for 3 more matched groups).

As mentioned above, go/no-go decisions will be taken according to the pathology. If no differences are found using a test already reported as a significant difference, the experiment will stop. In case there is no previous report about the test, the experiment will continue as a characterization.

B. The animals

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

For this experiment, rodents, including mice and rats, will be used. Different species, strain, and genetic background (also WT) animals can be included. The specie (3), strain based on the genetic background, gender (2) and age range will be adjusted according to the literature to the most suitable. According to the induced nervous system autoimmune pathology, the onset severity and progression of the disease can vary and also the extension of the model as described in Appendix 1 and Appendix 2.

These experiments will be tested in a preventive (before the animal develop the pathology, starting the treatment at the same time the pathology is induced) and therapeutic (after the pathology is developed in the animal model) regimen.

We distinguish the following groups 6-8 groups (build on phenotype, see below) x 3 to 4 conditions (saline, prevention, treatment, commercial treatment (therapy already tested that acts following the same pathways, as a positive control)).

1. Control – saline
2. Control – prevention
3. Control – treatment
4. Control – commercial treatment
5. Disease – saline
6. Disease – prevention
7. Disease – treatment
8. Disease – commercial treatment

9. Control – control (for studies where pain susceptibility tests are required)

Control groups are animals sham immunized or injected with an isotype control antibody and on one hand they are useful to detect the effect of the drug when there is no pathology and to subtract its effects, if present, from the effect on the disease groups taking into account the different setups of administration. On the other hand, there is another control group where the disease animals (and the controls), are injected with saline instead of the drug, which will give us the information of the correct development of the pathology (variances between experiments and animals have been observed) and that nothing is related with the injection procedure.

Using this experimental setup, both the effect of phenotype and the effect of the drug can be analyzed. Furthermore, it might be necessary to test different concentrations of the drug.

Based on theory, we estimate that we will need a maximum of 560 animals per drug study based on previous experience with similar models, for example to show a significance reduction of autoantibody

titers and disease scores in an EAMG model treated with proteasome inhibition. The maximum experiment size will be 140 ((20 animal/study group*4 groups) + (12 animal/ control group*4 groups)=128 animals + 12 animal for the pain test blank = 140), with 3 replication experiments + 1 dose finding study (140*4=560 animals). In this calculation we are taking into account that some animals will have the same conditions but will be sacrificed in different way according to the tissue analysis requirement for every drug and/or the possible necessity to divide the groups in 2 subgroups because of the tasks overlapping. Since we are planning to test 5 possible drugs, this will bring the maximum amount of animals to 2800. However, we expect that the final group size will be significantly smaller after a power calculation. If possible, we will make use of historical controls or control groups generated in previous studies to lower animal numbers and interim analysis to reduce group size.

Summarizing, a total of 2800 animals (1680 rats and 1120 mice) will be included in the "Therapy efficacy and side effect in nervous system autoimmune models" appendix.

All animals will be obtained from a registered supplier or a researcher who have specific animal models in case the registered supplier doesn't have it.

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.

In terms of replacement, these drugs have been validated extensively by *in vitro* experiments to prove their mechanism of action. However, current *in vitro* systems are not able to model all the aspects of these nervous system autoimmune pathologies which are a complex multifactorial disease involving the contribution of many systemic components. While some of these drugs are already used in humans for the treatment of e.g. multiple myeloma, these drugs first have to show beneficial effects in animal models before they can be used in humans. While we expect that the drugs will be beneficial, there might be unforeseen effects which may result in a worsening of the diseases. Therefore, these drugs first have to be evaluated in an animal model.

With the following experiment we want to validate the use of these drugs in different experimental nervous system autoimmune diseases and if we observe a significant beneficial effect the approval for clinical trials will be faster.

In terms of reduction we can limit the amount of animals by investigating several parameters at once like the contribution of the different phenotypes (disrupted BBB, different autoimmune diseases, etc.). Furthermore, because we are planning on testing at least 4 different drugs, we will analyze if it is possible that historical controls can be used, if cohort effects are absent. This will further limit the number of animals. Next, we also choose an animal model with strong behavioral effects. Furthermore, we will perform intermediate analysis to further reduce the number of animals if possible. By doing power calculations for sample size and implementing go/no-go criteria we further limit the amount of animals used.

In terms of refinement, we have chosen to use the most suitable animal model for each pathology (Appendix 2 and 3). This will limit the amount of time that animals are in experiment, and thus experience possible discomfort. Finally, we are going to adapt the accommodation and the care to the need of the animals.

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

We are going to adapt the accommodation and the care to the need of the animals. To limit animal discomfort; anaesthesia and analgesia will be used to reduce the discomfort of the animals during the invasive procedures (see Appendix 2 and Appendix 3). The interaction with the therapeutic agent tested has to be checked before. If the discomfort can be reduced, the subject will withdraw the experiment.

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

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.

The animals will be checked daily for any sign of pain or discomfort due to treatment or any other experimental procedures hereby described, and if any of these symptoms are detected, analgesics will be applied to relieve the suffering.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

We can expect adverse effect of the immunization and of the induced disease *per se*, for example, EAMG cause weakness and fatigability and in case of CNS, memory and some neurological and locomotors

impaired abilities can be expected (we can't be sure since no literature is available at the moment), which generate stress as explained more in detail in section K. There are no adverse effects related with the venipuncture or the NCS, neither in the behaviour or pain susceptibility tests.

Animals might experience adverse reaction because of the drugs administered and discomfort may be observed due to the pathology the model develops. These outcomes include increased anxiety, cognitive and neurological impairment locomotor deficits and stereotypical behavior. Furthermore, in some neuropsychiatric animal models, epileptic attacks may be observed. Other aspect compromising the welfare of the animals is the *i.p.* injection, which increases the risk of peritonitis and serous fluid production.

Explain why these effects may emerge.

Although some drugs are already used for other indications, some drugs have never been tested before. Therefore these drugs might cause unwanted side effects that may cause discomfort. Depending on dosage they are potent immunosuppressor. The dose that will be administered will be adjusted to the optimal conditions based on the literature or on dose finding pilot studies. However, unexpected interactions due to the autoimmune pathology cannot be ruled out.

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

Regular monitoring (daily) will prevent and minimize the severity of the welfare since the animals are going to receive pain killer, anesthetics and/or analgesics in case they are necessary (and allowed with the therapeutic agent). The administration site will be checked frequently (the immunization side as well as described in Appendix 2 and Appendix 3) to be sure that no complications appear. If any adverse reactions occur, drug dose will be lowered, or the experiment will be halted. Human endpoints are going to be considered if the animal showed a severe discomfort and euthanasia is going to be applied if the individual reach that status.

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.

Humane endpoints will be applied in case of rapid weight loss (>20% within 3 days without any improvement), severe acute inflammation at the immunization point (untreatable by the definition of the veterinarian). The following endpoints are unlikely for completeness we include them since some phenotypes have never been tested before. These includes prolonged diarrhea (>3 days), coughing, self-induced trauma, icterus and severe ulceration or bleeding (Recognition of pain and distress, Principles of Laboratory Animal Science, 2001).

We expect neurological symptoms related with autoimmune models where the CNS is target. The incapability to perform the behaviour tasks, the inability to eat and drink (recognized by dehydration signs, weight loss and general body condition) or the presence of continuous tremors, status elipticus or circling (symptoms from what the animal will not recover) are non expected symptoms that, in case of occur, will be taken as a humane endpoint and the animal will be sacrificed.

So human endpoints will be based on adverse reaction due to treatment. In case of unexpected severe adverse reaction the experiment will be halted.

Indicate the likely incidence.

The incidence will be dependent on the induced disease (Appendix 2 and 3), the character of it: severe or chronic, and on the therapeutic agent and its effects/side effects based also on the dose and the frequency and administration via. Because many combinations can be assessed, is quite hard to determine the incidence value. We estimate the incidence to be extremely low, in the order of 0-5% after a dose finding study. However, for the dose finding study, the incidence cannot be estimated due to the facts that the drug could be a new drug never tested before in vivo and many doses and injections via will be tried or never tested for an specific animal model, where the parameters will be fixed as well.

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').

All the animals will experience some degree of discomfort. The intermediate analysis of the behavioral, neurologic and/or locomotion tests cause mild to moderate discomfort. Operational procedures generate

mild discomfort in 100% cases, however, immunization evokes moderate discomfort. Since all the animals will undergo immunization (except the control group for pain tests), the added discomfort of all tasks is moderate.

References:

Agnieszka Krzyzanowska and Carlos Avendaño. Behavioral testing in rodent models of orofacial neuropathic and inflammatory pain. *Brain Behav.* 2012; 2(5): 678–697. doi: 10.1002/brb3.85

Atsushi Sato, Masashi Mizuguchi, Kazutaka Ikeda. Social interaction test: a sensitive method for examining autism-related behavioral deficits. *Protocol exchange | Community contributed.* 2013: doi:10.1038/protex.2013.046

Bailey KR, Crawley JN. Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5221/>

Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD. The Mouse Forced Swim Test. *Journal of Visualized Experiments : JoVE.* 2012;(59):3638. doi:10.3791/3638.

Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989; 32(3):777-85.

Curzon P, Rustay NR, Browman KE. Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5223/>

Deacon RMJ. Measuring Motor Coordination in Mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE.* 2013;(75):2609. doi:10.3791/2609.

Denic A., Johnson AJ, Bieber AJ., Warrington AE., Rodriguez M., and Pirko I.. The Relevance of Animal Models in Multiple Sclerosis Research. *Pathophysiology.* 2011; 18(1): 10.



Hidetoshi Takahashi, Ryota Hashimoto, Masao Iwase, Ryouhei Ishii, Yoko Kamio, and Masatoshi Takeda. Prepulse Inhibition of Startle Response: Recent Advances in Human Studies of Psychiatric Disease *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2011 Dec; 9(3): 102–110. doi: 10.9758/cpn.2011.9.3.102

Hughes RN, The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. 2004; 28(5):497-505.

Jones MV., Collongues N., de Seze J., Kinoshita M., Nakatsuji Y., Levy M. Review of Animal Models of Neuromyelitis Optica. *Mult Scler Relat Disord.* 2012; 1(4): 174–179.

Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR. Assessment of Social Interaction Behaviors. *Journal of Visualized Experiments : JoVE.* 2011;(48):2473. doi:10.3791/2473.

Kamens HM, Crabbe JC. The parallel rod floor test: a measure of ataxia in mice. *Nature protocols* 2007;2(2):277-81. doi:10.1038/nprot.2007.19

Katzav A, Ben-Ziv T, Blank M, Pick CG, Shoenfeld Y, Chapman J. Antibody-specific behavioral effects: Intracerebroventricular injection of antiphospholipid antibodies induces hyperactive behavior while anti-ribosomal-P antibodies induces depression and smell deficits in mice. *Journal of Neuroimmunology,* 2014: 272(1-2), 10–15.

Koolhaas JM, Coppens CM, de Boer SF, Buwalda B, Meerlo P, Timmermans PJA. The Resident-intruder Paradigm: A Standardized Test for Aggression, Violence and Social Stress. *Journal of Visualized Experiments : JoVE.*

2013;(77):4367. doi:10.3791/4367.

Kulkarni SK1, Singh K, Bishnoi M. Elevated zero maze: a paradigm to evaluate antianxiety effects of drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2007;29(5):343-8.

Lainiola M, Procaccini C, Linden AM. mGluR3 knockout mice show a working memory defect and an enhanced response to MK-801 in the T- and Y-maze cognitive tests. *Behav Brain Res.* 2014; 1 (266) 94-103. doi: 10.1016/j.bbr.2014.03.008.

Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P. Object recognition test in mice. *Nature Protocols.* 2013; (8) 2531–2537. doi:10.1038/nprot.2013.155

[REDACTED]

Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. *Prog Neurobiol.* 2010; 92(3):386-404.

Osuchowski Mf, Teener J, Remick D. Noninvasive model of sciatic nerve conduction in healthy and septic mice: reliability and normative data. *Muscle & nerve.* 2009; 40(4):610-616. doi:10.1002/mus.21284.

Planaguma, J.; Leypoldt, F.; Mannara, F.; Gutierrez-Cuesta, J.; Martin-Garcia, E.; Aguilar, E.; Titulaer, M.J.; Petit-Pedrol, M.; Jain, A.; Balice-Gordon, R.; et al. Human N-methyl-d-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain J. Neurol.* 2015, 138, 94–109.

Powell SB1, Zhou X, Geyer MA. Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia. *Behav Brain Res.* 2009 Dec 7;204(2):282-94. doi: 10.1016/j.bbr.2009.04.021.

Robert M.J. Deacon , Measuring Motor Coordination in Mice. *J Vis Exp.* 2013; (75): 2609. doi: 10.3791/2609

Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology.* 2004; 29 (11): 2007-17.

Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols.* 2006;1(2):848-858. doi:10.1038/nprot.2006.116.

Xie C, Sun J, Qiao W, Lu D, Wei L, Na M, Song Y, Hou X, Lin Z. Administration of simvastatin after kainic acid-induced status epilepticus restrains chronic temporal lobe epilepsy. *PLoS One.* 2011;6(9):e24966. doi: 10.1371/journal.pone.0024966.

Yang M, Crawley JN. Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N Crawley . [et al].* 2009;CHAPTER:Unit-8.24. doi:10.1002/0471142301.ns0824s48.

Zutphen L. F. M. Van, Baumans V., Beynen A. C.. Recognition of pain and distress .*Principles of Laboratory Animal Science, Revised Edition, 1st Edition, 2001.*

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be sacrificed at the end of the experiment if no adverse events happen. If the animal present severe discomfort or is suffering extremely, according to the human endpoint, this individual will

be sacrificed.

The sacrifice of the animals will be done according to the analysis requirements, in this case, based on the tissue characteristics. If fixed tissues have to be studied, perfusion is necessary to preserve the organ/tissue in an optimal way. Otherwise, normal sacrifice methods (cervical dislocation, CO inhalation) will be used.

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

DEC-advies PV 2016-005

Preambule:

De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 10700
2. **Titel van het project:** *Autoimmunity of the nervous system.*
3. **Titel van de NTS:** *Autoimmuniteit van het zenuwstelsel.*
4. **Type aanvraag:**
 - nieuwe** aanvraag projectvergunning
5. **Contactgegevens DEC:**
 - naam DEC; *DEC-UM*
 - telefoonnummer contactpersoon; [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon; [REDACTED]
6. **Adviestraject:** (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC-UM 06-10-2016
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken 14-10-2016
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD
7. **Afstemming IvD:**
 - De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD *dd. 06-10-2016.*
8. **Eventueel horen van aanvrager:** *N.V.T.*
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
 - Datum 24-10-2016
 - Gestelde vragen en antwoorden:

De DEC-UM heeft een aantal vragen en opmerkingen:

3.1 Achtergrond

Vragen:

- 1) Heldere achtergrond, met juiste referenties. De DEC-UM vraagt zich af waardoor patiënten auto-antilichamen aanmaken.
Graag hier wat meer achtergrond over geven, aangezien dit een belangrijk deel van de pathologie betreft (althoewel het geen doel van dit PV is).

Antwoord:

Autoimmune diseases are caused by the dysregulation of the immune system against molecules and tissues normally present in the body. It is known that in autoimmune diseases, the immune system is dysregulated and genetic and environmental factors play an important role in the different pathologies. There are several hypothesis that try to explain the origin of autoimmunity but to date only a few like molecular mimicry are more accepted to be at the origin of the deregulation of the immune system.
See Project Proposal > Background.

2) [Redacted]

Antwoord:

[Redacted]

3) In bijlage 3 onder B komen opeens experimenten aangaande de passage van de placenta “uit de lucht vallen” met de mededeling: “some autoantibodies are targeting fetal antigens, such as AChRy in which case we would use a model of pregnant animals being immunized to study the placenta transfer and effects on the offspring viability and on the fetus/neonate”. De DEC-UM wenst hiervoor een nadere toelichting.

Antwoord:

It is known that many molecules can be released from the mother to the fetus (Palmeira et al., 2012). Antibodies are an example of these molecules that can cross the placental membrane and affect the fetus. This has been investigated in autism spectrum disorder, where autoantibodies transferred by the mother can recognize fetal proteins, affecting the baby. However, this reactivity of the mother antibodies was not found in mothers with normal children (Braunschweig D. et al., NeuroToxicology, 2008). This can be also the case of other neuropsychiatric disorders like schizophrenia or bipolar disorder, among others. Because of this, we would like to test the influence of the autoantibodies against neuronal surface antigens, in the offspring and investigate if the antibodies also recognize and affect the fetus.
See Appendix 3 > B. The animals.

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1

Algemene opmerkingen:

De uitsplitsing in de experimenten is duidelijk, per deelsplitsing is de DEC-UM niet helemaal duidelijk wat welke rat ondergaat en welke doelen de verschillende onderdelen dienen.

Reactie:

Goals:

Appendix 1: to prepare the material needed for the generation of animal models, in case of monoclonal antibodies for the passive transfer, and to monitor the development of these animal models. For the last purpose, acetylcholine receptor (AChR) from the denervated rats will be used to monitor the anti-AChR titers in animal models and antibodies –monoclonal and polyclonal– will be used to detect the expression of the antigen in the tissues of the animal models for example in post-mortem studies).

- Rats will be used to extract the brain and process them for immunohistochemistry, that will be used to screen the immunoreactivity of patient sera/ cerebrospinal fluid (CSF) against neuronal proteins.
- Pregnant rats will be used to extract the embryos (the brain will be also extracted and used for the purpose mentioned above).
- Rat embryos (embryogenic day 18, E18) will be used to prepare primary cell culture (hippocampal and cortical cultures), to screen the immunoreactivity of patient sera/CSF against neuronal surface proteins and, in case of an unknown antigen is suspected, immunoprecipitation using the human sera/CSF will be performed to define the pathogenic antigen by mass spectrometry techniques.
- Male rats will be used to obtain large amounts of AChR, after denervation of the sciatic nerve of the hind leg, AChR is necessary for radioimmunoassay when testing the anti-AChR immunoglobulin levels of the EAMG animal model for example.
- Rabbits will be used for the production of polyclonal antibodies against the antigen of interest. This material will be used to perform assays like ELISA or to generate animal models passive transfer.
- Rodents (rats and mice) will be used to produce monoclonal antibodies against the antigen of interest. This material will be used to perform assays like ELISA or for passive transfer animal models.

Appendix 2: generation of active immunization animal models. Models for central and peripheral nervous system (CNS and PNS) will be developed to study the pathogenic mechanisms and the effect of the autoantibodies in a living organism. These animal models can be also used to test new drugs in App.4.

- Rats and mice will be used to develop autoimmune animal models by active immunization after the injection of the antigen of interest which is present in the CNS or PNS

Appendix 3: generation of passive immunization animal models. Models for CNS and PNS will be developed to study the pathogenic mechanisms and the effect of the autoantibodies in a living organism. In this case, the effect of the autoantibodies from a patient can be directly studied in the animal by the infusion of these molecules. These animal models can be also used to test new drugs.

- Rats and mice will be injected (intra venous, intra peritoneal or intra ventricular) with the immunoglobulins against a neuronal antigen from the CNS or PNS(the origin of the antibodies can be from purified patient sera or from a cloned antibody from a patient mainly. Also from other animals immunized with the antigen of interest).

Appendix 4: drug studies. We are going to use the animal models generated in appendix 2 and 3 to study the efficacy of a new or repurposed drug in a specific animal model.

See Project proposal. 3.2. Purpose

Opmerking:

U heeft het over een denervated rat, U gaat ergens tissue gebruiken, wat doet U met de konijnen? De DEC-UM verzoekt U specifiekere weer te geven wat waar met welke dieren gebeurt en waarom.

Reactie:

In the denervation part, only rats are going to be used. Rabbits are going to be used to generate polyclonal antibodies as mentioned in appendix 1. All the experiments performed in this appendix have different and independent purposes, but they are essential to perform the appendixes 2 to 4. The generation of AChR will be done by the denervation of sciatic nerve in one of the hind legs. It is known that the amount of receptors increases after the transection (Rochkind S. and Shainberg A., Photomedicine and Laser Surgery, 2013). Since we would like to obtain large amounts of AChR to be used (2 to 4 appendix), we will use male rats for this purpose; the muscles in this specific animals are larger and consequently as well the AChR production. On the other hand, rabbits will be used to generate polyclonal antibodies against any antigen (depending on the antigen injected to the animal). Rats and mice will be used to generate monoclonal antibodies.

See Project proposal . 3.2. Purpose (first aim)

See App1 > A. Experimental approach and primary outcome parameters > Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Vragen:

1) De DEC-UM vraagt zich af welke patiënten (groepen, hoeveel, welke samples, hoeveel worden er getest, hoeveel patiënten zijn nodig) er zijn geselecteerd ?

Antwoord:

We will use brain and primary neuronal cell cultures to screen for the presence of autoantibodies against neuronal antigens in patients with neurological and psychiatric disorders. We will use in house samples already stored in the department, we will keep receiving samples from other hospitals under an ethical approval of rest material and we are currently starting a study already approved by the METC. We will also include samples from control individuals.. Making an estimation, we will use approximately 5000 patient samples, including serum and CSF.

On the other hand, we will also perform animal models by passive transfer. In this case, the antibodies from the patient are going to be administered to the animal. After this step, the animal will be evaluated by different tests such as behavioral, neurological and motor skills.

Results will be compared with those performed by control animals to define the effect of the specific autoantibodies. Later on, post-mortem studies will be performed, analyzing the target organs to further understand the contribution they have in the pathology.

For this purposes, we will use rats and mice as described under appendix 2 and 3.

2)Kunt U voor deeldoel 3 aangeven hoe U de teststoffen selecteert en wat hieraan vooraf gaat?

Antwoord:

Under the subgoal 3 “Efficacy and side effects study of new or repurposed drugs to treat autoimmune diseases of the nervous system” we will use different tests according to the symptomatology of the animal (See Table 2 in appendix 2 and 3).

Based on the literature and the expertise of investigators in our department, we have divided the tasks in 5 different domains that cover all relevant phenotypes in an animal model with an autoimmune disorder affecting the nervous system. The domains are “ affect, cognition, motor, pain and neurologic”. We have included 2 main tests in each domain.

After the first experiment, we will analyze the data and see if any of the domains was more affected when compared with the control. If so, more tests targeting that domain will be performed in the next experimental group to deeply characterize the symptoms.

See Appendix 2 or 3 > A. Experimental approach and primary outcome parameters.

3) Cruciaal lijkt in dit PV het karakteriseren van de eiwitten c.q. antigenen en dat lijkt toch wat eiwitchemie te vooronderstellen. Zijn er eigenschappen (grootte of iets dergelijks) van potentiële eiwitten te noemen, waardoor al enige schifting kan worden gedaan?

Antwoord:

The preselection has been performed based on the autoantibodies already described in patients with psychiatric and neurological disorders. However, there is the possibility that new antigens will be described as potential targets for autoantibodies and because of this, they will fall under the aim of this proposal.

The antigens will be obtained from animals, for example AChR is obtained from *Torpedo californica* and purified from the electric organ of the fish using an affinity column with cobratoxin, that binds AChR. Other methods like ion exchange and size exclusion can be used to obtain highly concentrated membrane proteins. Another source of antigen will be by protein recombinant production using in vitro models using tags for the purification and/ or other known ligands of the protein.

See Project proposal > Background (last paragraph).

4) Ligt het niet voor de hand uw vraagstellingen eerst eens op te lossen middels toepassing van het EAMG-model en vervolgens de buitenbocht van het onderzoek te nemen?

Antwoord:

The use of the well-established EAMG animal model is mainly to study the effect of new drugs that affect anti-AChR auto-antibody levels and to generate enough preclinical data that allows them to be used in clinical trials for AChR-MG patients (appendix 4). This animal model will not be used in appendixes 2 and 3.

5) Daar U met name geïnteresseerd bent in de pathofysiologie van ionkanaaldefecten ligt gebruik van knockout-muismodellen dan niet in de rede?

Antwoord:

The proteins under study are located in the neuronal surface and they play crucial roles. However, this is not the reason why we still prefer to develop the experiments described for this purpose. Our aim is to study the effect and the mechanisms of action of the autoantibodies against these proteins. Since the effect of them can be different going from the blocking of the protein to the activation of the activity of the same protein, passing to the unfolding of the scavenger proteins, studying the protein through a knock out (KO) will only be relevant to the antibodies with a blocking mechanism of action, and we don't know if this will be the only effect of the autoantibodies.

See project proposal > 3.2 Purpose > Second aim.

3.4.2

Vragen:

1) Veel hangt af van de conservering van de verschillende targets tussen muis/ rat en mens. Kunnen de onderzoekers aangeven voor de verschillende targets die worden genoemd als potentieel belangrijk wat de conservatie is? Antilichamen zijn gericht tegen kleine stukjes eiwit (vaak 8 aa).

Antwoord:

Many groups around the world are currently using rodent proteins to screen the reactivity of human sera against neuronal proteins. This is because of the high homology between the rodent and the human proteins, around 90% (Lancaster E., et al., The Lancet Neurology, 2010, Meizan L, et al., Annals of Neurology, 2009). Fortunately, the pathogenic mechanisms and the role of the autoantibodies from humans can be studied using rodent animal models (see Table 1).

See Project proposal > 3.2 Purpose > First aim

See App1 > A. Experimental approach and primary outcome parameters > Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

Table 1. [Redacted]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

2) Wat is het nut van "nerve transection" als men is geïnteresseerd in antilichamen? Is dat niet ernstiger dan het matige ongerief dat er in appendix 1 aan wordt toegekend?

Antwoord:

As mentioned before; the nerve transection will be performed for the aim of generating material to follow the progression of the EAMG animal model (see answers to questions 5 and 6). The AChR obtained from the muscle from the transected rats will be used to determine the anti-AChR titers by using a radioimmunoassay (RIA) (see figure 1). We have included humane endpoints according to this experiment, but it is important to mention that any adverse effect involving muscle atrophy has been observed in the past by our team when a bilateral transection of the sciatic nerves was performed.

See Appendix 1 > J. Humane endpoints; A. Experimental approach and primary outcome parameters > Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

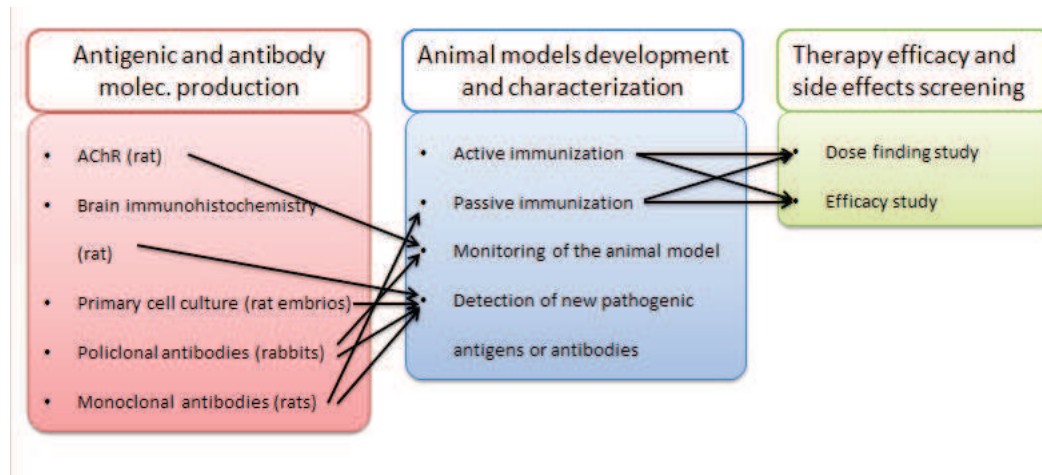


Figure 1. Correlation between the outcomes of each aim proposed in this protocol.

3) Er wordt hier gesteld dat “like before, *in vivo* and *in vitro* characterisation will be performed”. *In vitro* wordt nogal eens genoemd in het PV, maar niet nader aangeduid. Eigenlijk roept dit PV de vraag op of er geen *in vitro* screening mogelijk is als tussenstap naar proefdieronderzoek daar ieder potentieel eiwit rücksichtslos in proefdieren lijkt te worden getest. Kunt U de voorafgaande *in vitro* characterisation nader specificeren dan wel ziet U als mogelijkheid tot vermindering bijvoorbeeld gebruik van celcultures om een cytopathogeen effect zichtbaar te maken of met behulp van lymfocyten activatie ervan teneinde een voorscreening van de potentiële eiwitten te doen?

Antwoord:

As soon as we receive the patient material we will search for the pathogenic autoantibodies using *in vitro* techniques like immunohistochemistry on rat brain and cell based assay, where the protein of interest (the different neuronal antigens in this case, individually), are overexpressed in the surface of the cells. Using this assays we expect to define which of the known antigens is the pathogenic in this specific patient. If we find that none of the autoantibodies are reactive with known antigens, we will perform an immunoprecipitation using rodent material and primary cell cultures from rodents to identify the antigen, additionally we will study the autoantibody effector mechanisms *in vitro*.

Afterwards, we will perform animal studies, since we would like to understand the mechanism of action of the specific autoantibodies *in vivo*. This is also a requirement to fully demonstrate the autoimmune origin of the disease.

3.4.3

Algemene opmerkingen:

Prima coherentie tussen de verschillende aims. Zou mooi zijn om de verschillende aims nog terug te zien in het schema.

Reactie:

In the project proposal, we have created a low chart schema with all the aims (blue boxes) and the relation between them, where the go/no go criteria are also included. Under the first aim, antigenic and antibody molecules production we will produce molecules to generate and/or characterize the development and progression of known or new nervous system autoimmune animals models and screening and identification of novel autoantibodies targeting molecules in the nervous system in human diseases. For this we will use adult rat tissue, embryonic rat tissue, and rabbits or rodents for antibody generation, as we deeply explain in appendix 1.

Under the second aim we include the next two appendixes, appendix 2 and 3, where we aim to create animal models of autoimmune diseases targeting specific neuronal proteins presents in the CNS or PNS. We will use rodents for this and we will follow an active or a passive immunization to develop the model. For this aim, we will use material obtained from the appendix1/aim 1 or from external sources (commercially available, material from patients, material provided from other researchers, etc.). The monitoring of this animal models will be done using also material obtained from appendix 1. The last aim focused in the drug efficacy study and the side effects it can be found under appendix 4. To test the new or repurposed drug we will use animal models developed under aim 2.

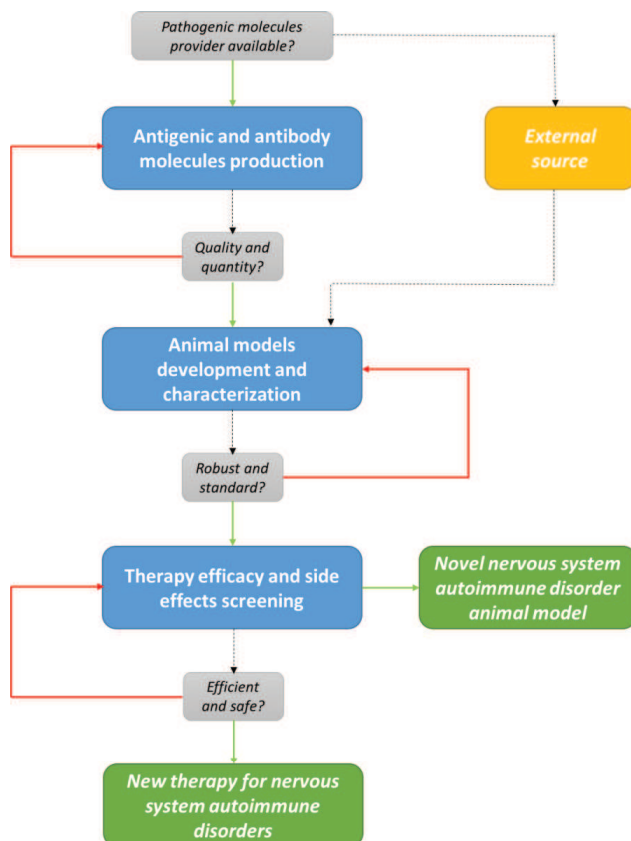


Figure 2. Flow chart showed in project proposal where the aims are described in blue and indirectly correlated with the appendixes and the go/no-go criteria defined.

Vragen:

- 1) De DEC-UM vraagt of U “A no go criteria will be determined by a not strong enough difference between the animal model and its control or because of non-reproducible data between the different experiments” nader kunt specificeren.

Antwoord:

Since the animal models concerning CNS and autoimmunity are not well established yet, we do not know which phenotype we would expect. Because of this constraint, we will follow the procedures performed by authoritative laboratories which already performed similar experiments to characterize other autoantibodies and their targets in the past. If no differences are observed between the model and its control, we will modify some parameters (concentration, administration via, frequency, etc.) to see whether the effect of the antigen/antibodies can be shown.

See Project proposal > 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.

- 2) U geeft ondermeer middels een figuur de go/no go-momenten aan. Elders schrijft U (ondermeer in appendix 2) dat met betrekking tot het fenotype het resultaat robuust en standaard moet zijn.

Vervolgens doet U dit go/no go criterium ernstig verwateren met de opmerking dat dan “changes (e.g. species, gender, route of administration, frequency, dose, adjuvants, etc.) will be implemented to try to generate a robust and standard animal model. Vindt U dit ook geen erg rekbaar go/no go-moment?”

Antwoord:

As explained before, most of the animal models, concerning CNS autoimmune disorders, have not been established yet. We will follow the protocols performed previously by competent groups but, due to the differences in the antigen/ autoantibodies, the phenotype can differ. If so, changes will be developed to generate an animal model where the effect of the pathogenic autoantibodies is visible when translated into symptoms. Once we observe differences, we will repeat the experiment using the same conditions to study the reproducibility (robust).

See Project proposal > 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.

3.4.4

Appendix 1

A.

Vragen:

- 1) Andere weefsels dan hersenen worden als controle mee genomen. Hoe zeker zijn de onderzoekers dat deze weefsels niet ook een positief signaal kunnen hebben en dus goed controle weefsel zijn?

Antwoord:

Brain immunohistochemistry has been used by many groups as a reliable technique to detect immunoreactivity against neuronal antigens in patient sera and/or CSF. This technique allows you to exclude an unspecific reactivity. Next these results can be confirmed by hippocampal primary cell culture afterwards. Finally, to identify the antigen which the autoantibodies are targeting, techniques like cell based assay will be used.

We will test the unspecific signal using the sera/CSF from a healthy control, and we will expect no staining on the brain slices. Using another tissue will not solve the question, since the proteins of interest are highly expressed in brain and not in other tissues.

See Appendix 1 > A. Experimental approach and primary outcome parameters

- 2) Verwijder het woord “Female” en begin met “Rats” aangezien ook mannetjes ratten gebruikt kunnen worden.

Antwoord:

Thank you for the correction.

- 3) De DEC-UM vraagt zich af of dit in een deel appendix kan, er worden zulke verschillende handelingen gedaan, volgens de DEC-UM zijn daar de appendices voor bedoeld. Juist om de verschillende handelingen per deexperiment goed in kaart te brengen? De DEC-UM vindt het nu niet bij elkaar passen, omdat er volledig verschillende zaken gedaan worden.

Antwoord:

We have clarified the text following the comments above and we expect it to be now more clear for the reader. We generate the material to 1) screen and identify the presence of pathogenic or unknown antigens that play a role in neurologic and psychiatric disorders to 2) create animal models and follow the progression of those. In appendix 4, we would like to test drugs to treat the animal models developed in appendixes 2 and 3 described before.

4) Welke alternatieven heeft U overwogen om CFA niet te gebruiken?

Antwoord:

For the generation of monoclonal or polyclonal antibodies Complete Freund's Adjuvant (CFA) is not required., but for animal models it is needed, See Appendix 1 > A. Experimental approach and primary outcome parameters.

[Redacted text block]

See Appendix 2 > A. Experimental approach and primary outcome parameters.

B.

5) Kunnen de onderzoekers aangeven wat de conservatie is tussen konijn en mens?

Antwoord:

Since rabbits are going to be used to obtain polyclonal antibodies that will only react against the injected antigen (from different origins: human, mouse, rat, etc. depending on our interests), it is not necessary to determine the conservation of the proteins between rabbit and human. We will not inject the animal with CFA (that breaks the tolerance and helps to generate antibodies against self-antigens), despite we will inject Incomplete Freund's Adjuvant (IFA). Therefore, the generated antibodies will only target the foreign (injected) antigen.

See Appendix 1 > A. Experimental approach and primary outcome parameters (at the end).

6) Waar komt het humaan materiaal vandaan? Is de aanvoer zo onzeker? Kan dat niet worden gestroomlijnd?

Antwoord:

[Redacted text block]

This human material will be used in the material obtained in appendix 1 and also to generate passive transfer animal models, described in appendix 3 (autoantibodies cloned or purified) to study in vivo effects and the mechanisms of action. Human material will be indirectly used also in appendix 4 if a therapy is tested in a passive transfer animal model generated using human material.

See Appendix 1 > B. The animals.

7) Dit lijkt niet gebaseerd op de beschikbare teststoffen maar op de dieren?

Antwoord:

[REDACTED]

See Appendix 1 > B. The animals.

We are sorry, but it is not clear to us, what is meant with “dit” and “teststoffen”. We assume it is either the generation of antibodies or antigenic tissues. Both is not dependent on animals, but on the availability of human materials or commercial antibodies. So, we will generate antibodies in case these are not commercially available to an affordable price (for the purpose of ELISA). The generation of antibodies for passive immunization purpose depends on if the antibody is available from patients (e.g. plasmapheresis material) or not. Also, the generation of antigenic tissue depends on how much human sera we have available to be tested for autoantibodies.

8) Wat gebeurt er met de konijnen?

Antwoord:

Rabbits are going to be used to produce polyclonal antibodies. They will be injected intravenously with the antigen of interest and will develop antibodies against it (but not against self-antigens). After a period of time, when the antibody titer will be in the correct range (tested periodically), we will sacrifice the animals and extract the blood, purify for IgGs and use this material for in vitro experiments.

See Appendix 1 > A. Experimental approach and primary outcome parameters (at the end); B. Animals and D. Replacement, reduction, refinement.

9) Betreft het bilaterale neurectomie?

Antwoord:

We will perform a unilateral transection of the sciatic nerve since we were advice not to do a bilateral transection by the Instituut voor Dierenwelzijn (IvD) due to the discomfort of the animals caused by a bilateral neurectomie. The application of a bilateral transection would have decreased the number of animals by half.

See Appendix 1 > A. Experimental approach and primary outcome parameters

10) Zou gebruik van meer dieren ten aanzien van Ach-receptorooft neurectomie bij een kleiner aantal dieren kunnen voorkomen?

Antwoord:

No, we could not.. It is known that the amount of receptors is increased under the transection by the sprouting of the nerves to create new muscle terminals (Rochkind S. and Shainberg A., 2013). We would like to obtain large amounts of AChR, so we will use larger animals (male rats) for this purpose. The muscles in this gender of animals are larger and consequently the AChR production will be more prominent.

11) In de 2e alinea 120 inclusief 60 moeders, in de laatste zin, optelsom, lijkt het over 120+60 te gaan.

Antwoord:

We have to include both where, 60 pregnant rats will be used for embryonic primary cell culture and 120 female rats will be used for brain material. Because the time points when we will use these animals can be different (i.e. if we don't need neuronal primary cell cultures at the beginning but we still need brains from adult rats, if we use all the rats included in the proposal for rat brain but not for rat brain and embryos, later on, we will not have rats left for the embryonic neuronal cell culture). Although, as a reduction we will try to include the 60 pregnant female rats into the 120 female rats that we will use for brain tissue to reduce the number of animals. Another source of reduction are the surplus material that we will try to get from other researchers working in the field, brains for example from other groups in the university. We are currently trying to set up the primary cell culture of neurons using neonatal pups, since some groups in the university are presently using these animals and we can get the brain as rest material. However, we have to still include the pregnant rats although the technique is now under revision and the availability of surplus pup issue has not fixed. See B>Animals and D. Replacement, reduction, refinement.

D.

12) Typo: hypridoma = hybridoma

Antwoord:

Thank you for the correction.

13) Waarom worden er zowel polyclonale als monoclonale abs geproduceerd?

Antwoord:

Polyclonal antibodies will be used to label the organs where the antigens are expressed to see for example if the injection of autoantibodies reduces the density of the protein targeted in certain areas. On the other hand, the monoclonal antibodies can be used for the purpose mentioned before, but also to generate passive transfer animal models (Kreye J., et al. Brain, 2016).

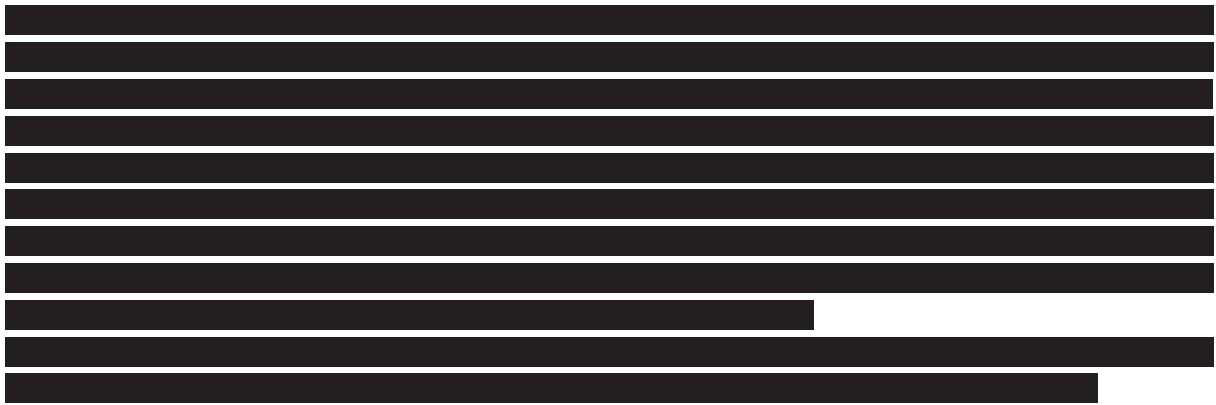
See Appendix 1 > A. Experimental approach and primary outcome parameters (at the end).

14) Mogelijk iets noemen over alternatieven CFA?

Antwoord:

For the generation of monoclonal or polyclonal antibodies Complete Freund's Adjuvant (CFA) is not required., but for animal models it is needed,

See Appendix 1 > A. Experimental approach and primary outcome parameters.



See Appendix 2 > A. Experimental approach and primary outcome parameters.

I.

15) U geeft aan “For the last issue, anesthesia or analgesia will be administered to the animal if required”. Brengt U dieren met paralysis posterior 48 uur na de zenuwdoorsnijding wederom onder narcose en voor hoelang?

Antwoord:

After the procedure we will use analgesia, not anesthesia. Anesthesia will be only used during the procedure.

See Appendix 1 > H. Pain and pain relief, I. Other aspects compromising the welfare of the animals.

J.

16) De Paralysis posterior noemt U niet onder de humane eindpunten. Hoe lang tolereert U dit ziektebeeld?

Antwoord:

Animals will be euthanized in case of self-mutilation or autotomy after nerve transection. Pain related with muscle atrophy will be reduced by the use of analgesics if needed. However, it is important to mention that according to our experience, none of the animals followed these behavior, even receiving a bilateral transection.

See Appendix 1 > J. Humane endpoints.

Appendix 2

Algemene opmerking:

Helder uiteen gezet, 2-15 testen per dier, waar is de keuze van 15 op gebaseerd?

Antwoord:

[Redacted answer]

See section A in Appendix 2 and 3.

A.

Vragen:

1) De DEC-UM vraagt zich af wat de onderzoekers bedoelen met “Stability of the antigen”? Als het antigeen niet stabiel is kan dit vals positieve (of negatieve) resultaten opleveren. Hoe controleren de onderzoekers dit om dit te ondervangen?

Antwoord:

With stability of the antigen we mean the half live of the molecule in vivo and the absorption/metabolization using different routes of injection, for example. It is important to mention that all these information will be checked in the literature before, to adjust the strategy to the most suitable.

In some cases, it will be difficult when there is no previous experience in the field available. Therefore, in those cases it will be decided based on the outcome results of the animal model (for example, the antibody titers against the specific antigen can be tested using RIA or ELISA).

- 2) De onderzoekers gebruiken als controle een saline injectie. Dit ondervangt niet de pijn/ het ongerief dat de dieren ondergaan met CFA. Kunnen de dieren hierdoor niet een gedragsverandering ondergaan? Is niet uit te sluiten dat antilichamen die ook buiten de hersenen werken, indirect gedragsveranderingen worden verkregen.

Antwoord:

We will include 3 groups of animals:

1. Animals injected with the antigen + CFA □ animal model
2. Animals injected with saline + CFA □ control 1, animal without the disease
3. Animals injected with saline □ control 2, animal without any immunogen agent injected

With this approach we will be able to know the specific effect of the antigen, by analyzing the effect of the antigen and the effect of the CFA. It is also important to define the effect of CFA since this has never been tested before and maybe it enhances the pain and discomfort sensation in the animals.

See Appendix 2 > A. Experimental approach and primary outcome parameters.

- 3) Is het te verwachten dat de dieren een gedragsverandering ondergaan vanaf injectie tot aan 6-9 weken behandeling?

Antwoord:

We actually expect the animal to develop a progressive disorder based on the effect of the autoantibodies in the target. As mentioned in EAMG, the effect of the autoantibodies against the AChR is visible after 3-4 weeks from the immunization time point.

- 4) Is het te verwachten dat de dieren antilichamen ontwikkelen tegen eigen antigenen?

Antwoord:

Yes, it is. This is the purpose of animal models for the active immunization indeed. We intend animals to generate antibodies against the administered antigen, fortunately, the tolerance breakage (CFA injection), could also cross react with the self-antigen and have an effect on it. This has been proved in EAMG and other models (see answer to question 4 in section A, Appendix 1).

- 5) Met welke gedragstesten brengt u schizofrenie in beeld?

Antwoord:

As mentioned before, since there is not enough information in this field, so based in one study run by Planaguma et al., 2015 and after advice of the behavioural experts we have proposed 5 different domains including:

- 1) Affect: Elevated zero maze test , sucrose preference test and pre-pulse-inhibition (PPI)
- 2) Cognition: Alternating Y-maze and object recognition task
- 3) Motor: Open field and rotarod
- 4) Pain: Von Frey
- 5) Neurologic: Electroencephalography (EEG)

After the first pilot, we will analyze the data and see whether any of the domains investigated were affected more than the others. Then we will increase the number of tests into those specific domains to try to characterize them better. The tests will be chosen based on the non-overlapping of outcomes and the non-alteration of the results because of the application of all of them together (bias). In case those interactions between tests are observed at mid-term evaluation of the results, each group will be subdivided and the animals will follow different set of tasks, reducing the bias in this way.

See Appendix 2 and 3 after the table where the tasks are explained.

- 6) U geeft voor de power analyse slechts een power aan van 0,8 en een significantie van 0,05. Hoe zit het met de andere (uitlees)parameters van de poweranalyse? (idem voor bijlage 3)

Antwoord:

For power calculations on appendix 2 and 3 we will use the effect size as a quantitative measurement of the strength of the phenotype of the animal model. Taking into account the next assumptions: a very large-huge effect size ($d=1.20-1.40$; Sawilowsky, S. Journal of Modern Applied Statistical Methods, 2009) and a power of 0.80 (Cohen J., Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences, 1988), with an $\alpha=0.05$ for two-tailed and $\alpha=0.025$ for one tailed, we will need 9-12 animals per group.

As parameters we will use, in active immunization animal models: IgG titers and weight measurements with some phenotype characteristics (in case of CNS, all the tests proposed in the 5 domains that we will perform in the first pilot) to see whether there are differences or not between the animal model and the controls.

- 7) Een test voor psychose lijkt te ontbreken.

Antwoord:

We have included the pre-pulse-inhibition in the battery of tests. However, we will use different tests that covers most of the areas affected by neurologic and psychiatric disorders. We will perform test to check the welfare of the animals regarding affection, cognition, motor abilities, pain sensitivity and neurological impairment. The only area of psychiatric disorders that cannot be covered when compared with the human situation is the presence of hallucinations.

See Appendix 2 and 3 after the table where the tasks are explained.

- 8) Welke taken voor het bestuderen van schizofrenie-gerelateerde fenotypen worden er meegenomen? Valt het niet aan te bevelen o.a. een pre-pulse-inhibition (PPI) -taak toe te voegen?

Antwoord:

We have included PPI in the affect domain if available in the department. Thanks for your suggestion. See also answer to question 5 in this section.

- 9) In hoeverre zouden verschillende gedragsveranderingen niet een indirecte maat voor sickness behaviour kunnen zijn? Het valt te verwachten dat een auto-immuunrespons in vele gevallen specifieke effecten teweegbrengt die de algehele gezondheidstoestand van het dier beïnvloeden, hetgeen op zijn beurt veranderingen in de voorgenomen gedragstaken kan veroorzaken die los staan van psychopathologie. Hoe denken de onderzoekers hiervoor te corrigeren?

Antwoord:

We expect the symptomatology or phenotype caused by the disease, to be specific due to the injection of the antigen. After the development of autoantibodies against the antigen injected we expect the target tissues to be affected and cause the phenotype. We will be able to at least determine the pure effect of the autoantibodies in the antigen since we will include a control with an injection of saline + CFA and another control with only saline. Also, we will be able to analyze the post-mortem material, which will show the presence of autoantibodies in the target organ and the damage caused by them.

J:

Vragen:

- 1) Missen bij deze humane eindpunten geen verschijnselen van het zenuwstelsel, want er zijn toch mogelijk ook neurologische complicaties te verwachten, die minder wenselijk zijn ook ten aanzien van het beoogde model? (idem voor bijlage 3 en 4).

Antwoord:

We expect neurological symptoms related with autoimmune models where the CNS is target. The incapability to perform the behaviour tasks, the inability to eat and drink (recognized by dehydration signs, weight loss and general body condition) or the presence of continuous tremors, status epilepticus or circling (symptoms from what the animal will not recover) are non-expected symptoms that, in case of occur, will be taken as a humane endpoint and the animal will be sacrificed.

See appendix 2 and 3> humane endpoints.

Appendix 3:

A.

Vragen:

- 1) De onderzoekers volgen 5 verschillende routes van passieve immunisatie. De DEC-UM vraagt zich af of dit een stapsgewijze aanpak is? Als een manier werkt, moeten dan de andere 4 ook nog volgen?

Antwoord:

We have included different routes of administration due to the diversity of target of the autoantibodies that will be administered to the animal. This parameter will be chosen according to the target, but only one route of administration will be performed. The administration of autoantibodies doesn't need the injection of an adjuvant and luckily it can be directly administered in the organ of target, for example, the brain in case of CNS animal models by intra-ventricular injection or using animal models with a disrupted blood brain barrier (BBB).

See appendix 3 > A. Experimental approach and primary outcome parameters.

- 2) U geeft voor de power analyse slechts een power aan van 0,8 en een significantie van 0,05. Hoe zit het met de andere (uitlees)parameters van de poweranalyse?

Antwoord:

For power calculations on appendix 2 and 3 we will use the effect size as a quantitative measurement of the strength of the phenotype of the animal model. Taking into account the next assumptions: a very large-huge effect size ($d=1.20-1.40$; Sawilowsky, S. Journal of Modern Applied Statistical Methods, 2009) and a power of 0.80 (Cohen J., Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences, 1988), with an $\alpha=0.05$ for two-tailed and $\alpha=0.025$ for one tailed, we will need 9-12 animals per group.

As parameters we will use, in active immunization animal models: IgG titers and weight measurements with some phenotype characteristics (in case of CNS, all the tests proposed in the 5 domains that we will perform in the first pilot) to see whether there are differences or not between the animal model and the controls.

In case of passive transfer animal models, weight measurements and the outcome of the tests performed to cover the 5 domains will be taking into account.

J:

- 3) Missen bij deze humane eindpunten geen verschijnselen van het zenuwstelsel, want er zijn toch mogelijk ook neurologische complicaties te verwachten, die minder wenselijk zijn ook ten aanzien van het beoogde model?

Antwoord:

We expect neurological symptoms related with autoimmune models where the CNS is target. The incapability to perform the behaviour tasks, the inability to eat and drink (recognized by dehydration signs, weight loss and general body condition) or the presence of continuous tremors, status epilepticus or circling (symptoms from what the animal will not recover) are non-expected symptoms that, in case of occur, will be taken as a humane endpoint and the animal will be sacrificed.

See appendix 2 and 3> humane endpoints.

Algemene opmerkingen:

- Hier staat CO als dodingsmethode!

Antwoord:

We will use cervical dislocation to sacrifice those animals that will not need to perform a perfusion.

Appendix 4:

A.

Vragen:

- 1) De DEC-UM vraagt zich af wat bedoeld wordt met “prevention”?

Antwoord:

Prevention is a regimen of treatment where the administration of the drug starts before the disease has been developed, in case of an animal model, specifically in the EAMG, the administration of the medication starts the same week the animals are immunized.

J:

- 2) Missen bij deze humane eindpunten geen verschijnselen van het zenuwstelsel, want er zijn toch mogelijk ook neurologische complicaties te verwachten, die minder wenselijk zijn ook ten aanzien van het beoogde model?

Antwoord:

We expect neurological symptoms related with autoimmune models where the CNS is target. The incapability to perform the behaviour tasks, the inability to eat and drink (recognized by dehydration signs, weight loss and general body condition) or the presence of continuous tremors, status epilepticus or circling (symptoms from what the animal will not recover) are non-expected symptoms that, in case of occur, will be taken as a humane endpoint and the animal will be sacrificed.

See appendix 2 and 3> humane endpoints.

- Datum antwoord 12-12-2016
- Verstreckte antwoorden: *Zie hierboven.*
- De antwoorden hebben wel geleid tot aanpassing van de aanvraag

10. **Eventuele adviezen door experts:** (niet lid van de DEC-UM) **N.V.T.**

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. **Ja**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe** aanvraag.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
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.
Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan.

De DEC-UM vertrouwt erop 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-UM 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? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.

N.v.t., daar dit buiten de taakstelling van de DEC valt overeenkomstig artikel 18a.2.b van de Wod.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van fundamenteel onderzoek.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen.

Zie antwoord op vraag C5.

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 fundamenteel wetenschappelijke project, dat gericht is op inzicht in de rol die auto-antilichamen spelen bij ziekten van het zenuwstelsel, zijn de proefdieren, de onderzoekers, de doelgroep/patiënten en hun naasten, en ook de medische wetenschap en de samenleving als geheel.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en de gevolgen daarvan en de opoffering aan het eind van de proeven. Het merendeel van de proefdieren zal gering en matig ongerief ondervinden, voor de overige dieren wordt het ongerief geclassificeerd als ernstig.

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers vergaren kennis over de ziektemechanismen van auto-antilichamen in het zenuwstelsel.

De onderzoekers zullen medisch-wetenschappelijke kennis verkrijgen die relevant is in het onderzoek naar neurologische en neuropsychiatrische aandoeningen en deze kennis delen met de wetenschappelijke gemeenschap.

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: Uiteindelijk kan meer kennis over de mogelijk auto-immune oorzaak van hun neurologische en neuropsychiatrische symptomen leiden tot verbeterde therapeutische mogelijkheden. Daardoor zou de kwaliteit van leven van deze patiënten en hun naasten verbeterd kunnen worden.

Groei van medische kennis en mogelijke uitbreiding van het therapeutische arsenaal op een gebied waar daaraan behoefte is, in casu de neurologie en psychiatrie, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. Daarom heeft dit onderzoek ook belang voor de samenleving als geheel.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wetgeving.

N.v.t., daar dit buiten de taakstelling van de DEC valt overeenkomstig artikel 18a.2.b van de Wod.

Proefopzet en haalbaarheid

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

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's.

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. Licht uw antwoord toe.

De DEC-UM is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC-UM leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wod voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw antwoord toe. **N.V.T.**

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan omdat het om wetenschappelijke redenen noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht toe waarom wel/niet.

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is.

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren.

De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.

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

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en de gevolgen daarvan. De dieren worden aan het eind van de proef opgeofferd.

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

Naar de mening van de DEC-UM zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord.

De DEC-UM is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel.

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

Naar de mening van de DEC-UM is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat zulks mede gebaseerd op statistische analyse middels een poweranalyse.

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

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Hierbij heeft de DEC-UM onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.

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. Onderbouw uw antwoord.

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat en mede gezien het daartoe strekkende antwoord van de aanvrager in de projectaanvraag heeft de DEC-UM reden aan te nemen dat onnodige duplicatie achterwege blijft.

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.

In onderhavige projectaanvraag worden niet uitsluitend dieren van een eenvormig geslacht gebruikt. Alhoewel de DEC-UM vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en de aanvrager kortgesloten dient te worden daar de DEC niet betrokken is bij de fok en aankoop van proefdieren.

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

Naar de mening van de DEC-UM is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager.

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

Adoptie is ten aanzien van onderhavige aanvraag niet opportuun daar het hier niet handelt om niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren.

NTS

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

Naar de mening van de DEC-UM is zulks het geval.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag.

Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in de rol die auto-antilichamen spelen bij ziekten van het zenuwstelsel, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "Autoimmunity of the nervous system?".

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.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: *matig nadeel.*

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: *substantieel voordeel.*

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: *matig voordeel.*

Algemeen: *relevante groei van medische kennis.*

De DEC-UM is van mening dat de belangen van de medische wetenschap en de samenleving in het algemeen en van de patiënten en hun naasten binnen het project "Autoimmunity of the nervous system" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na voornamelijk gering en matig ongerief, tot de dood. Zij worden door de experimenten en de consequenties daarvan in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren wordt geschaad door de experimentele handelingen en de gevolgen daarvan, en door de opoffering aan het eind van de proeven.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot kennis over onderliggende mechanismen van auto-immuun ziekten en auto-antilichamen van het zenuwstelsel karakteriseren bij patiënten. Er zullen nieuwe doelwitten worden geïdentificeerd als basis voor nieuwe therapeutische strategieën.

De verwachting is dat de verworven inzichten op termijn bouwstenen kunnen leveren voor een betere behandeling van patiënten, die lijden aan aandoeningen van het zenuwstelsel. Dergelijke aandoeningen manifesteren zich veelal op relatief jonge leeftijd en resulteren in een aanzienlijke, langdurige en chronische ziektelast en zorgbehoefte, die niet alleen voor de patiënt maar ook voor diens naasten zeer belastend is. Het huidige therapeutische arsenaal is beperkt. Door een verbeterde therapie zou uiteindelijk de kwaliteit van leven verbeterd kunnen worden van belangrijke aantallen patiënten en hun naasten.

Daarnaast is passende zorg voor deze categorie patiënten tijdrovend en kostbaar. Dit onderzoek heeft daarom ook belang voor de samenleving als geheel. Vandaar dat de DEC-UM het onderhavige onderzoek van substantieel belang acht.

Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. anesthesie en pijnbestrijding, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3. Beantwoord de centrale morele vraag.

De DEC-UM beantwoordt de centrale morele vraag: "Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in de rol die auto-antilichamen spelen bij ziekten van het zenuwstelsel, de opoffering en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project Autoimmunity of the nervous system?" bevestigend.

Hoewel de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-UM is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie. In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De DEC-UM is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Er zijn voldoende go/no go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden. De DEC-UM is ervan overtuigd dat er geen alternatieven zijn, waardoor deze dierproef met minder ongerief of met minder, dan wel zonder levende dieren zou kunnen worden uitgevoerd. Op grond van deze overwegingen beschouwt de DEC-UM de voorgestelde dierproeven in het projectvoorstel "Autoimmunity of the nervous system" als ethisch gerechtvaardigd. Derhalve voorziet de DEC-UM het projectvoorstel "Autoimmunity of the nervous system" van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

X De DEC-UM adviseert de vergunning te verlenen onder de voorwaarde dat: indien een fenotype niet gekarakteriseerd wordt als robuust en standaard er dan bij het aanbrengen van eventuele wijzigingen (e.g. species, gender, route of administration, frequency, dose, adjuvants, etc.) in het induceren van dit fenotype, hiertoe toestemming wordt verkregen per modificatie van de IvD, dan wel DEC overeenkomstig de richtlijn meldingen/wijzigingen.

2. Het uitgebrachte advies is **unaniem** tot stand gekomen.

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.

N.v.t. Daarenboven is de DEC-UM niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD107002017808

Bijlagen

2

Datum 3 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 januari 2017. Het gaat om uw project "Autoimmunity of the nervous system". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD107002017808. 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:

3 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD107002017808

Datum:
3 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017808

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: PhD Student
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: Autoimmunity of the nervous system
Titel niet-technische samenvatting: Autoimmunititeit van het zenuwstelsel
Naam DEC: DEC-UM
Postadres DEC: Postbus 616 ([REDACTED] 48), 6200 MD Maastricht
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: [REDACTED]
Plaats: Maastricht
Datum: 2 januari 2017

Datum:
3 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017808



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD107002017808

Bijlagen

2

Datum 3 januari 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 3 januari 2017

Vervaldatum: 2 februari 2017

Factuurnummer: 170808

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD107002017808	€ 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

Universiteit Maastricht

████████████████████
Minderbroedersberg 4-6
Postbus 616
6200MD Maastricht
████████████████████

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD107002017808

Uw referentie

Bijlagen

Datum 30 januari 2017
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte ██████████,

Op 2 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Autoimmunity of the nervous system' met aanvraagnummer AVD107002017808. 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:

- 1) U beschrijft in uw aanvraag dat dieren door middel van decapitatie worden gedood. Deze dodingsmethode is in bijlage IV van de richtlijn toegestaan indien onderbouwd waarom geen andere in dezelfde bijlage benoemde methode kan worden gebruikt. We verzoeken u de keuze voor decapitatie te onderbouwen.
- 2) In bijlage 1 van uw aanvraag meldt u zowel volwassen dieren als embryo's/pups te willen gebruiken. Echter is voor ons niet duidelijk hoe veel embryo's/pups worden ingezet omdat hun aantal in de berekening niet is opgenomen. Hoewel embryo's (in het laatste trimester van zwangerschap) niet in de NVWA registratie worden opgenomen, moeten ze in een projectvergunning worden gemeld. We verzoeken u om het aantal embryo's/pups ook in uw aanvraag aan te geven.
- 3) In bijlages 2 en 3 van uw aanvraag ontbreekt het percentage dieren dat de humane eindpunten kunnen bereiken. Zou u deze alsnog willen invullen?
- 4) U geeft in uw aanvraag aan dat het geslacht van de dieren per experiment wordt bepaald. Daarnaast schrijft u dat vrouwelijke Wistar ratten en mannelijke Lewis ratten worden ingezet, dat alleen vrouwelijke konijnen worden ingezet en het geslacht van de muizen wordt niet gespecificeerd. Zou u duidelijker het geslacht van de dieren willen beschrijven en nader kunnen onderbouwen waarom hiervoor wordt gekozen?

5) In de NTS geeft u aan dat 4% van de dieren ernstig ongerief zullen ervaren. Dit is echt niet terug te vinden in de aanvraag. Zou u dit punt willen uitleggen en aanpassen waar nodig?

6) Daarnaast benoemt u 'myasthenis gravis' in uw NTS, een term die waarschijnlijk niet bekend is bij het brede publiek. Zou u deze term willen uitleggen of verwijderen?

7) U beschrijft in uw aanvraag antigenen en antilichamen te willen gebruiken. Kunt u meer informatie geven over de selectiecriteria waarop u de keuzes van antigenen en antilichamen zult baseren?

8) U beschrijft verschillende diermodellen van auto-immuniteit, mede opgezet gebruik makend van nieuwe targets. De CCD vreest hierbij voor ernstig ongerief. Kunt u onderbouwen waarom u er niet van uitgaat dat ernstig ongerief kan optreden?

9) In bijlage 1 beschrijft u drie verschillende experimenten, elk met aparte handelingen en doelstelling. De CCD is van mening dat de samenhang tussen deze experimenten niet voldoende is om ze in dezelfde bijlage te kunnen opnemen. Op deze wijze is moeilijk om de rode draad in deze bijlage te volgen en het splitsen in aparte bijlages zou misschien enkel onduidelijkheden verhelderen. Om de behandeling van uw aanvraag niet verder te vertragen, is de CCD bereid om uw aanvraag administratief te splitsen. Dat houdt in dat u de bijlage niet meer fysiek hoeft te splitsen, maar wel het verschil in leges tussen 4 bijlagen (€1684) en 6 bijlagen (€1970) = €286 dient te voldoen. Indien u hiermee instemt, kunnen we u een factuur voor het verschil in bedrag sturen.

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Gebruik hierbij het formulier dat u bij deze brief krijgt indien u uw antwoord per post verstuurt.

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. 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.

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.



Melding

Bijlagen via de post

- 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

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager | | |
| Postcode | | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer | |
|----------------|--|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.
- | | |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | | |
|--------------|---|------|
| Naam | | |
| Datum | - | - 20 |
| Handtekening | | |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht
t.a.v. ██████████
Minderbroedersberg 4-6
Postbus 616
6200MD Maastricht
6200MD

**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD107002017808

Uw referentie

Bijlagen

Datum 30 januari 2017
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Dear members of the Central Commissie Dierproeven,

On January 30, 2017 we have received your feedback on the project permit for animal testing "Autoimmunity of the nervous system "with application number AVD107002017808. In this document you can find the answers and they have been implemented in the specific documents when necessary (all changes are underlined).

We hope to cover all the questions and please, if there is something not clear, don't hesitate to contact us.

Welke informatie nog nodig

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

1) U beschrijft in uw aanvraag dat dieren door middel van decapitatie worden gedood. Deze dodingsmethode is in bijlage IV van de richtlijn toegestaan indien onderbouwd waarom geen andere in dezelfde bijlage benoemde methode kan worden gebruikt. We verzoeken u de keuze voor decapitatie te onderbouwen.

Animals in early stage of development or embryonic stage can only be sacrificed by decapitation (appendix 1) to avoid damaging ther tissue and organs around the neck. Since we are interested in the brains, this is a crucial point. This now has been clarified in appendix 1, section A-1.

2) In bijlage 1 van uw aanvraag meldt u zowel volwassen dieren als embryo's/pups te willen gebruiken. Echter is voor ons niet duidelijk hoe veel embryo's/pups worden ingezet omdat hun aantal in de berekening niet is opgenomen. Hoewel embryo's (in het laatste trimester van zwangerschap) niet in de NVWA registratie worden opgenomen, moeten ze in een projectvergunning worden gemeld. We verzoeken u om het aantal embryo's/pups ook in uw aanvraag aan te geven.

Making an estimation, we will use around 600 embryos in a period of 5 years (10 mothers, with 10 embryos/mother approximately). This now has been clarified in appendix 2, section B-1.

3) In bijlages 2 en 3 van uw aanvraag ontbreekt het percentage dieren dat de humane eindpunten kunnen bereiken. Zou u deze alsnog willen invullen?

In appendix 2, where active immunization animals are developed, we can estimate, based on previous experience in EAMG animal models, that 0-5% of the animals will reach humane endpoints. However, in active immunization targeting other antigens presents in the central nervous system, such an experiment has not been performed before, so we cannot estimate the number of animals that will reach humane endpoints. Based on EAE animal models; where 10% of the animals decrease their body weight more than 20%, which is the most standardized measurement used as humane endpoints, we expect to reach a similar percentage for some antigens (see appendix 2, section J).

In appendix 3, where animal models are developed by passive immunization, there is no literature available about the percentage of animals who had reach humane endpoints in the few experiments that have been performed. Because of this, since the targets are the same than in appendix 2, we expect the same percentage of animals that will reach the humane endpoint. However, it is important to mention, that in this case animals will not build the immune response, since they will already receive the antibodies and the duration of the experiment will be shorter, we think that the number of animals reaching the humane endpoints will be smaller than 5%. This now has been clarified in see appendix 3, section J.

4) U geeft in uw aanvraag aan dat het geslacht van de dieren per experiment wordt bepaald. Daarnaast schrijft u dat vrouwelijke Wistar ratten en mannelijke Lewis ratten worden ingezet, dat alleen vrouwelijke konijnen worden ingezet en het geslacht van de muizen wordt niet gespecificeerd. Zou u duidelijker het geslacht van de dieren willen beschrijven en nader kunnen onderbouwen waarom hiervoor wordt gekozen?

For polyclonal antibody production, there is a preference for female animals (rats and mice) because females are reported to be group housed more successfully than males because females are more docile and less aggressive in social interaction (Hendriksen and Hau, 2003). This now has been clarified in project proposal, section 3.2, first aim.

For the generation of animals models by active or passive immunization, the selection of the gender will depend on the available literature and the standardized guidelines available for each model. For example, as described in appendix 2, the active immunization model for myasthenia gravis or EAMG is standardized by using Lewis female rats. However, there are other models where the gender is not robustly established. An example of it is that, in the literature we have found described no differences between male and female mice in some of the strains, such as C57Bl6, one of the most common strains used in experiments related with our research (Papenfuss T. L., et al., Journal of Neuroimmunology, 2004). This data is in correlation with some studies where mice have been injected with patient autoantibodies, where in some cases both males (Hammer c. Et al., Molecular Psychiatry, 2014; Planaguma J. Et al., Brain, 2015) and females (Castillo-Gomez R. Et al., Annals of Neurology, 2016) were chosen. Because of this, we would like to keep open the decision on the mice gender, since we will adapt it to the most recent literature before starting the experiment. This now has been clarified in project proposal, section 3.2, second aim.

5) In de NTS geeft u aan dat 4% van de dieren ernstig ongerief zullen ervaren. Dit is echt niet terug te vinden in de aanvraag. Zou u dit punt willen uitleggen en aanpassen waar nodig?

We apologize for the mistake in the NTS, we have corrected this. As specified in all the appendixes, all animals will experience some degree of discomfort from mild to moderate due to the behaviour, neurological and locomotor tests and the operational procedures. The immunization with Complete Freund's Adjuvant (appendix 2) and the unilateral nerve transection (appendix 1-section 3) will generate moderate discomfort as well. The animals, due to the procedures or the development of the disorder will not reach severe discomfort, since we will observe them daily and they will be sacrifice before that, according to the described humane endpoints. This now has been corrected in NTS, section 3.5.

6) Daarnaast benoemt u 'myasthenis gravis' in uw NTS, een term die waarschijnlijk niet bekend is bij het brede publiek. Zou u deze term willen uitleggen of verwijderen?

Myasthenia gravis is one of the well-known autoimmune disorders, where the autoantibodies target molecules presents in the neuromuscular junction, such as acetylcholine receptor, resulting in a weakness and fatigability clinical symptomatology. There are many animal models that reproduce the human disorder by active or passive immunization and which have been used to describe the targets, study the pathogenic mechanisms and define the efficiency of new therapies to treat the disease. This now has been clarified in the NTS and project proposal, section 3.1.

7) U beschrijft in uw aanvraag antigenen en antilichamen te willen gebruiken. Kunt u meer informatie geven over de selectiecriteria waarop u de keuzes van antigenen en antilichamen zult baseren?

We are interested in neuropsychiatric disorders with an autoimmune origin. We have based our selection in the literature but this does not mean that other antigens and its autoantibodies will be included in case of been detected. Antigens such as NMDAR, AMPAR, GABA_B, GABA_A, VGKC associated proteins among others still unknown have been described as a target in some neuropsychiatric cases but there is still a lot to do to describe the pathogenic mechanisms underlying the disease in these cases and in others, where the target remains still unknown. As mentioned in the relevance of the study, the presence of autoantibodies in neuropsychiatric disorders is not a routine nowadays in most of the clinics around the world and this makes the detection and the description of these targets more difficult. The increase in the knowledge will directly benefit those patients with an autoimmune origin, since they can be treated, whether in another way, a chronic treatment with antipsychotics is administrated. This now has been clarified in project proposal, section 3.2.

8) U beschrijft verschillende diermodellen van auto-immuniteit, mede opgezet gebruik makend van nieuwe targets. De CCD vreest hierbij voor ernstig ongerief. Kunt u onderbouwen waarom u er niet van uitgaat dat ernstig ongerief kan optreden?

All the animal models developed by active or passive immunization will develop a phenotype of mild discomfort that will progress to moderate discomfort with time, since we are working with chronic diseases but also with acute models in some cases. We observe and test the animals daily, which help us to describe the clinical status and the progression of the disorder. When animals reach humane endpoints, they are sacrificed to avoid extra suffering, which will be translated to a severe phenotype. It is important to mention that, due to the chronicity of the

diseases we are working on in most of the cases, this process will not happen suddenly, so the increase of discomfort will be observed, treated in case it is possible, or finished with the sacrifice of the animal. In case of the acute models, the animals will be monitored in a more exhaustive way to identify the presence of any excess of discomfort. This now has been clarified in appendix 2 and 3, section I.

9) In bijlage 1 beschrijft u drie verschillende experimenten, elk met aparte handelingen en doelstelling. De CCD is van mening dat de samenhang tussen deze experimenten niet voldoende is om ze in dezelfde bijlage te kunnen opnemen. Op deze wijze is moeilijk om de rode draad in deze bijlage te volgen en het splitsen in aparte bijlages zou misschien enkel onduidelijkheden verhelderen. Om de behandeling van uw aanvraag niet verder te vertragen, is de CCD bereid om uw aanvraag administratief te splitsen. Dat houdt in dat u de bijlage niet meer fysiek hoeft te splitsen, maar wel het verschil in leges tussen 4 bijlagen (€1684) en 6 bijlagen (€1970) = €286 dient te voldoen. Indien u hiermee instemt, kunnen we u een factuur voor het verschil in bedrag sturen.

We agree with the CCD suggestion and we have divided the appendix 1 in 3 different sections into the same document and labelled them as different appendixes for administrative purposes:

- Section 1: Brain tissue insolation
- Section 2: Antibody generation
- Section 3: Acetylcholine receptor extraction

Opsturen binnen veertien dagen

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. U kunt dit aanleveren via NetFTP. Gebruik hierbij het formulier dat u bij deze brief krijgt indien u uw antwoord per post verstuurt.
Send the adjustments within 14 days to NetFTP. (email)

Wanneer een beslissing

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat uw aanvraag compleet is. 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.

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.



Melding

Bijlagen via de post

- 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

- 1.1 Vul de gegevens in.
- | | | |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager | | |
| Postcode | | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?
Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.
- | | |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer | |
|----------------|--|

2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.
- | | |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |
| <input type="checkbox"/> | |

3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- | | | |
|--------------|---|------|
| Naam | | |
| Datum | - | - 20 |
| Handtekening | | |
- Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Dear member of the Central Commissie Dierproeven,

We would like to thank you for the feedback received on the PV 2016-005: "Autoimmunity of the nervous system", by application number AVD107002017808.

We have answered the questions in this document and implemented the answers in the NTS, the project proposal and the appendixes 1 to 4 when necessary (all changes have been underlined). We have also made references to the documents when this will help to the understanding of the answer.

We would like to know if it is possible for you to check a small modification we have made in the Drug treatment appendix (appendix 4, project PV 2016-005).

In this appendix we have explained the animal experiments we would like to perform to test new or repurposed drugs in different animal models. For this purpose, we have included a maximum of 9 different groups where we have included different therapeutic regimens in control groups (max of 4 * 12 animal/group) and disease groups (max of 4 * 20 animal/group) and an extra group to be able to subtract the effect of the vehicle or sham-treatment. The experiment can be replicated 3 times and an extra experiment for the dose finding is included, if required.

However, [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED], since although most of the drugs are dissolved in saline; there is the possibility that the drug is dissolved in another vehicle. This modification also affects the group named control – control.

The modification mentioned will not change the number of animals specified in the appendix and it is important to mention that not all the groups will be necessary in all the experiments; it will depend on the purpose of each drug therapy experiment.

The changes concerning the last question in appendix 4 have been highlighted in yellow to distinguish from the ones related with the feedback answer. Please let us know if it is possible to rename the groups we would like to have in the animal experiments related with drug testing.

We hope to cover all the questions and please, if there is something not clear, don't hesitate to contact us.

With many kind regards,

[REDACTED]



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'. 10700
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Maastricht University
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|---|
| 1 | Generation of antigenic and antibody sources (section 1, 2 and 3) |
- 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 creation and isolation of antigen and antibody rich material using animals to generate and follow the progression of the animal models and the drug screening on them. The same material will be used to identify novel pathogenic antigens in patient's material, which is a positive feedback process to generate novel animal models to describe the pathogenic mechanisms underlying the disease and try therapeutic approaches to treat them. This will include:

- Section 1: Brain tissue insolation: isolation of brain tissue where the antigens are highly concentrated and insolation and culture of cells from different brain areas to obtain primary neuronal cell cultures, astrocytes and microglia
- Section 2: Antibody generation: generation of antibodies by immunization to use them on the development of passive models or other screening purposes
- Section 3: Acetylcholine receptor extraction: isolation of the AChR located in the peripheral nerves and muscle tissue

The primary outcome of this section is based, on one hand, on the generation of diagnostic assays to improve the detection of antibody mediated autoimmunity in central nervous system (CNS), generating rat embryonic primary neuronal cell lines and rat adult brain slices for fluorescent or normal staining, two techniques already well established as a diagnostic method in patients with neurologic and psychiatric

impairment. Neuronal antigens are expressed in high densities in the brain when compare with other tissues in the body and have a high interspecies homology (Table 1), so all known autoantibodies causing CNS diseases in humans cross-react with the rat antigen (Lancaster E., et al., 2010, Meizan L, et al., 2009). For this purpose, pregnant female rats and the embryos/pups will be recovered by caesarean section between embryonic day 18 (E18) and birth. The mother will be sacrificed in any case and the brain isolated for use as described above. All these procedures fall into Section 1 of Appendix 1.

For the generation of *in vivo* antibodies, described in section 2 of Appendix 1, we will follow the code of practice for the immunization of laboratory animals. Weekly injections of the antigen of interest are performed, (*s.c.*) to the animal until the immunoglobulin levels reach the peak of expression, around 2-6 weeks after the first injection. The best time point will be determined by testing IgG levels in the blood of the animals (obtained from saphenous vein, every 3-10 days maximum, following the NC3R guidelines for blood sampling).

The use of strong adjuvants (like Complete Freund's Adjuvant, CFA) is required to break tolerance to self-antigens (autoimmunity models by active immunization, see appendix 2). However, for general antibody production (as required here), the use of alternative adjuvants (like incomplete Freund's adjuvant, IFA) will be enough since for this purpose autoimmune reaction is not required. Later on, the animal will be sacrificed and material (e.g. serum and/or splenocytes) will be used for the induction of a passive transfer autoimmune animal model (see appendix 3) and/or to assess the development and the progression of the animal models (see appendix 2 and 3).

On the other hand, the generation of acetylcholine receptor (AChR) is included in this project, specifically in section 3 of Appendix 1, using a denervation technique, where large amounts of the antigens will be generated and then isolated (Rochkind S. and Shainberg A., 2013). The protein (antigen) obtained can be used to perform assays where antibodies from patients or other animal models can be identified and it will also help to generate the active immunization models for AChR (Appendix 2).

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

Section 1: For the neuronal primary cell cultures the animals will be sacrificed (by decapitation, since animals in early stage of development or embryonic stage can only be sacrificed by decapitation to avoid damaging the tissue and organs around the neck. Since we are interested in the brains, this is a crucial point) between embryonic day 18 (retrieved from the uterine horn) and just after birth to create primary cell lines of different cell phenotype. The age depends on the antigen of interest and the expression profile during the certain age. The cells will be used for a diagnostic test to analyse whether autoantibodies against brain antigens are present in serum or cerebrospinal fluid (CSF) of patients with potential central nervous system (CNS) autoimmunity or autoimmune rodent models. Additionally, these cells will be used for *in vitro* assays to study the pathogenic effect of patient autoantibodies on neuronal cells, e.g. internalization of antigen and alteration in ion channel function. Primary cell culture will preferentially be obtained from the unused pups coming from the breeding of the other animal procedures described in this proposal. We are currently working on the setting up of the embryonic cell culture assay, using 1 day born animals, since some groups in the university are regularly working with these animals and we could take the brain as a surplus material.

Rats will be sacrificed to isolate the brain and tissue from other organs (e.g. liver, spleen, etc.) to use as control. The tissue is used for immunohistochemistry (IHC) with patient's IgG in serum or CSF as primary antibody and immunoprecipitation of human autoantibodies. This method is common for the detection of autoantibodies against neuronal antigens in patients, since the homology between the human and the rat proteins is higher than 92% (Lancaster E. 2010; Meizan L. et al., 2009) (Table 1). It is preferred over the use of human post mortem material for different reasons: (a) The antigens are spread over the whole

brain, so the complete brain has to be used for the method, but usually a limited amount of serum/CSF is available to do the staining, which leads to practical difficulties on human brain tissue. (b) The fixation and freezing of the tissue has to be done in a very consistent way to guarantee trustful, replicable diagnostic assays; human tissue is commonly fixed with formaldehyde or freshly frozen, which is not the optimal preparation of the tissue for our purpose. (c) Additionally, the post mortem delay significantly affects the sensitive antigens and introduces variability that might lead to misdiagnosis (false positive or false negative) of autoantibody presence. The animals used for this purpose will mostly be the mothers of the embryos used for creation of primary cell cultures. Yet, during times in which no experiments with embryos are necessary, females from breeding, and males will be also used for the purpose of brain isolation. In case no embryos are required at this period and a denervation experiment is ongoing, brain from the denervated males (section 3) will be also used for this purpose since no gender differences have been identified. It is important to mention that when no primary cell cultures are necessary, brains from rats euthanized in experiments from other researchers at the university will be used in case they are available.

Table 1.

Section 2: For the generation of antibodies in animals, rabbits and mice will be immunized with the antigen of interest. Animals will be tested for raising immunoglobulin levels in serum to determine the number of antigen injections and to sacrifice the animals at the highest peak of antibody levels. Animals will not follow any other kind of tasks and control animals are not required for this purpose. If any of the animals develop a phenotype, as a result of the immunization, the standard humane endpoints (section J) will be applied. For this purpose, the preservation or the homology between the proteins in human and rabbit/rodent is not necessary, since the animal will only develop antibodies against the antigen injected, and we will determine the animal species in advance based on our specific interest. The antibodies generated, in this case polyclonal antibodies, will be used to label the organs where the antigens are expressed, to see, for example, if the injection of autoantibodies reduces the density of that specific protein. On the other hand, monoclonal antibodies can be used for the purpose mentioned before but also to generate passive transfer animal models (Kreye J., et al. Brain, 2016).

Section 3: For the antigen enriched tissue generation of AChR generation, male rats will have a sciatic nerve transection in one of the hind legs. We will use 9 week old (275g) male rats, since those specimens are bigger and the amount of muscle is more abundant due to hormonal differences. In female rats the effect of estrogen on the nervous system would induce a variation that would request higher number of animals per group. Animals will undergo a partial sciatic nerve transection under complete anesthesia in one of the hind legs (unilateral) to reduce the discomfort. Peri and post-operative analgesia will be applied for min 3 days post-operative, prolongation on indication. After the intervention, the nerve will start recovering by sprouting and new neuromuscular junctions will be created, with a higher expression of AChR (Rochkind S. and Shainberg A., 2013). Two weeks later, animals will be brought under

anaesthesia and sacrificed. Afterwards, the receptor derived from rats will be isolated and used in multiple experiments in appendixes 1, 2 and 3. The active immunization models for AChR-MG (immunized using *Torpedo californica* AChR (tAChR)) results in an antibody production targeting not only the tAChR, but also the rat AChR. The amount of antibodies in the serum is a good indicator for the severity of disease in these animals. However, in order to be able to measure the concentration of antibodies against the AChR in the serum of rodents, a radioimmuno assay (RIA) needs to be carried out, wherein the rodent AChR is a necessary reagent. To this end, the animals of this appendix will be euthanized and the carcasses will be then used to extract the antigen.

The methods are operational for some antigens e.g. AChR. For those neuronal antigens that are yet to be identified, the protocol might have to be changed, e.g. the animal might need to be perfused for optimal preparation of the tissue.

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

The number of animals is based on the literature and on previous experience (Elmariah SB et al., 2005, Dalmau J. et al., 2008). As described below we will also make use of rest material of other rodent studies at Maastricht University to minimize the number of animals.

B. The animals

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

Section 1: Rats will be used for this experiment, based on previous experience. Wistar female pregnant rats is the most suitable strain for primary cell culture and brain tissue material based on the literature (however no strain and gender changes has been observed using brains for IHC in our group), while Lewis male rats are the most convenient for sciatic nerve transection due to the biggest size (directly proportional to the muscle and AChR) (e.g. 9 week old Wistar male rat with 275g weight aprox.).

[REDACTED]

We estimate to use one pregnant rat (~10 embryos/pups) per month, so in a period of 5 years: 60 mothers and 600 embryos or pups.

Animals will only be sacrificed upon need. According to the patient material available, one or two animals at a time will be sacrificed. It is known that 1 animal serves around 100 usable brain slides, which will each allow testing one human sample for antibody presence. We expect to need around 2 animals per month, which means 120 rats over a period of 5 years. However, we are currently already performing this method with tissue from other department of the University which is giving sufficient supply for our current experiments and we already have a biobank of around 15 brains for this purpose, so numbers are likely to be much lower (or even zero) if other departments continue doing similar experiments.

Section 2: For polyclonal antibody generation, animals which can mount a strong immune response are desirable taking into account that the material generated will be larger. For this purpose, there is a preference for female animals because females are reported to be group housed more successfully than males because females are more docile and less aggressive in social interaction (Hendriksen and Hau, 2003). Because of this, female rabbits are the best option for obtaining large quantities of antibodies. We have planned to generate antibodies against a maximum of 6 different antigens and for each we will use a maximum of 15 animals (based on previous experience, which means maximally 90 animals for this

purpose). Additionally, we will use mice for monoclonal antibody generation. In that case, we will use maximal 10 animals per antigen (6 antigens), so a total of 60 mice.

Section 3: For the denervation experiment, an estimated number of 18 adult male Lewis rats will be used based on previous experience. We use adult rats, because we want an antibody repertoire of the adult tissue. In the other appendixes included in this proposal, we will need AChR for about 1500 antibody determinations/experiment with a maximum of 3 repetitions. For each determination, it is necessary to have 150 µl of receptor in solution, which means a total of 675 ml of AChR receptor solution ($1500 \times 3 \times 0.150 = 675 \text{ml}$). In the RIA the standard curve corrects for the concentration of antigen. From an adult rat, 37.5 g of muscle tissue is suited for receptor isolation and taking into account the conversion factor of 600 ml receptor suspension/500g muscle, only 45 ml of receptor solution can be obtained from each individual ($600 \text{ ml} / (500 \text{ g} / 37.5 \text{ g/rat}) = 45 \text{ ml/rat}$). Based on these values, 15 animals will be required to provide enough antigen for the assays proposed. However, experiments in the past have shown that there is a failure rate of 15 % in animals undergoing sciatic nerve transection surgery. Therefore, three additional animals are necessary. In total, we use a max. of 18 **male rats**.

A total (maximum) of 348 animals (198 rats, 90 rabbits, and 60 mice) are included in this appendix. All animals will be obtained from a registered supplier. These numbers

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.

Concerning refinement, the animals will be housed in groups and with enriched cages to allow species typical behavior. We do not expect any discomfort as the animals will not undergo any procedures in the primary neuronal cell culture and brain slices (section 1) but we expect moderate discomfort in the sciatic nerve resection (section 3). For antibody production (section 2), refinement will take place by using anaesthesia and analgesia for the invasive procedures which minimize the discomfort of the animals.

Concerning generation of antigenic tissue (section 1 and 3), replacement by e.g. cell lines is not possible, because cancer cell lines express many antigens that create background staining of the human antibodies and thereby false positive results.

- For antigen specific tests, some expression systems for e.g. NMDAr, AMPAr, LGI1, and Caspr2 are available and we are using those.
- No cell line exists which overexpresses the receptors/ion channels (complex membrane channel, composed of 4 or more subunits) for this purpose taking into account international guidelines.
- For brain material source, if no embryonic primary cell lines are required, we will ask for rats of other animal studies or we will use, in case a denervation experiment is running, the brains from those animals. Human brain tissue is not an option to use in IHC, since the amount of tissue we can access is low, the quality and fixation of post-mortem human tissue is not of sufficient quality and the size of the human brain is too large, requiring an unrealistic amount of human serum to be tested.

Concerning the production of antibodies (section 2), we will only make use of animals in case there is no hybridoma or expression vector available for producing the antibody targeting the antigen of interest.

- Rabbits are the most suitable species to generate antibodies *in vivo* but as a replacement Lewis female rat are also a good option based on their enhanced immune response described when generating active immunization models.

Reduction will be considered by using surplus animals when available for the isolation of brains (section 1) and also the brains from the pregnant females and the rat males used for AChR isolation (section 3) but not from the immunized animals (section 2) since the structures can be modified by the presence of antibodies. For the primary cell culture of neuronal tissue (section 1), we are currently trying to set up the technique using 1 day postnatal animals since some groups are regularly working with these animals in the university and they don't need the brain.

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

The well-being of animals will be checked daily and in case of severe suffering or disease (not expected) animals will be sacrificed according to the humane endpoints.

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 tissue will be used to characterize autoantibodies in patient serum or CSF or to determine antibody presence in autoimmune models described in all the other appendices. We are analysing sera and CSF of individuals that have not been characterized before. This is assured by communicating with the clinical center that provides the patient material. To our knowledge from conferences and literature there are still many autoantibodies to neuronal antigens still unknown of which the function is not studied.

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

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.

The animals used for antibody production (section 2), will be administered with analgesia in case of discomfort on the injection site. During the nerve transection, animals will be anesthetized (section 3). Additionally, we will use pain killers pre and post-operatively. Optimal procedures will be discussed and decided on with the local IvD/AWB when writing the working protocols.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

From immunization with the antigen (section 2), we expect the development of a normal autoimmune reaction including inflammation and starting symptoms of the disease. From the use of incomplete adjuvants, we expect pain in the injection area and a boost of the immune reaction. Due to nerve transection (section 3) we expect locomotion impairments and possibly pain development of the wound after the surgery.

Explain why these effects may emerge.

The only discomfort could arise from complications in the pregnancy (section 1) and sciatic nerve transection (section 3). The transection can impair movement of the hind limbs or paralysis for 48 hours after surgery. For the last issue, analgesia will be administered to the animal if required. Post-operative (also after immunization) analgesia will be applied for min. 3 days post-operative, prolongation upon indication.

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

Animals will be monitored daily. If any adverse reactions occur (not expected) the experiment will be halted. The discomfort generated by antigen immunization (section 2) will be covered with analgesics. The discomfort generated by the nerve transection (section 3) will be diminished with the use of pain killers pre and post-surgery. If animals have problems feeding, we will make use of liquid food or extra rich food to increase the weight or keep it constant. We will also make sure that the animals are able to reach food and water at all times. Humane endpoints will be applied.

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.

Humane endpoints (sections 1 to 3) will be applied in case of rapid weight loss (>20% within 3 days without any improvement), severe acute inflammation at the immunization point (section 2) (untreatable by the definition of the veterinarian) and in case of self-mutilation or autotomy after nerve transection (section 3). It is important to mention that according to our experience, none of the animals followed these behavior, even receiving a bilateral transection.

The following endpoints are unlikely, but for completeness we include them since some phenotypes have never been tested before. These include prolonged diarrhea (>3 days), coughing, self-induced trauma, icterus and severe ulceration or bleeding (Recognition of pain and distress, Principles of Laboratory Animal Science, 2001).

Indicate the likely incidence.

We expect 0-0.5% of cases will reach the humane endpoints. We do not expect any problems from the pregnant rats to obtain primary cell cultures and brain tissue (section 1). For *in vitro* autoantibody generation (section 2) we do not expect any severe symptomatology since the duration of the experiment will not allow the development of it. For denervated animals (section 3), animals can suffer discomfort due to the paralysis and stress related.

K. Classification of severity of procedures

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

The procedure is a non-recovery procedure for neuronal tissue generation and organ collection (section 1 to 3). The discomfort related with the antibody production (section 2) will be moderate, due to the immunization with incomplete Freund adjuvant or similar and the animals will only suffer an immune reaction with a mild expression of the disease. In case of sciatic nerve denervation (section 3), the discomfort is moderate. The discomfort generated by the nerve transection will be diminished with the use of pain killers pre/post-surgery. Later on the discomfort is based on the paralysis of the hind legs. The animals will be able to move crawling 48h post-surgery and they will be sacrificed after a period of 2 weeks.

References:

Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet neurology*. 2008;7(12):1091-1098. doi:10.1016/S1474-4422(08)70224-2.).

Elmariah SB, Oh EJ, Hughes EG, Balice-Gordon RJ Astrocytes regulate inhibitory synapse formation via Trk-mediated modulation of postsynaptic GABAA receptors. *J Neurosci*. 2005 Apr 6; 25(14):3638-50.

Kreye J, Wenke NK, Chayka M, Leubner J, Murugan R, Maier N, et al. Human cerebrospinal fluid monoclonal N-methyl-D-aspartate receptor autoantibodies are sufficient for encephalitis pathogenesis. *Brain* 2016; 139 (Pt 10): 2641–52. doi:10.1093/brain/aww208

Lancaster E, Lai M, Peng X, Hughes E, Constantinescu R, Raizer J, Friedman D, Skeen MB, Grisold W, Kimura A, Ohta K, Iizuka T, Guzman M, Graus F, Moss SJ, Balice-Gordon R, Dalmau J. Antibodies to the GABA(B) receptor in limbic encephalitis with seizures: case series and characterisation of the antigen. *Lancet Neurol*. 2010 Jan;9(1):67-76. doi: 10.1016/S1474-4422(09)70324-2

Meizan Lai, Ethan G. Hughes, Xiaoyu Peng, Lei Zhou, Amy J. Gleichman, Huidy Shu MD, Sabrina Matà, Daniel Kremens, Roberta Vitaliani, Michael D. Geschwind, Luis Bataller, Robert G. Kalb, Rebecca Davis, Francesc Graus, David R. Lynch, Rita Balice-Gordon, Josep Dalmau. AMPA receptor antibodies in limbic encephalitis alter synaptic receptor location. *Annals of Neurology*. 2009 Apr;65, (4): 424–434. doi 10.1002/ana.21589

Rochkind S. and Shainberg A.. Protective Effect of Laser Phototherapy on Acetylcholine Receptors and Creatine Kinase Activity in Denervated Muscle. *Photomedicine and Laser Surgery*. October 2013, 31(10): 499-504. doi:10.1089/pho.2013.3537.

Zutphen L. F. M. Van, Baumans V., Beynen A. C.. Recognition of pain and distress .Principles of Laboratory Animal Science, Revised Edition, 1st Edition, 2001.

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.

It is necessary to sacrifice the animals to extract cells to start primary cell culture or extract antigenic and antibody tissue.

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

- a) This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- b) A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- c) For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- d) 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'.	10700	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	University Maastricht	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		2	Active immunization in rodents

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 development of active immunization rodent models for autoimmune mediated diseases that target antigens in the nervous system. Depending on the antigen that is used to immunize the animals, different nervous system pathologies can be developed. We intend to immunize with neuronal receptors and ion channels leading to autoimmune encephalitis including N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) and other receptors (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor; AMPAR and B gamma-aminobutyric acid receptor; GABA_BR) or channel associated proteins such as Leucine-rich glioma inactivated 1 (LGI1) or contactin associated protein 2 (Caspr2) which are associated to the voltage gated potassium channel (VGKC), but also antigens in the peripheral nervous system (PNS), expressed in the neuromuscular junction (NMJ), which includes the acetylcholine receptor (AChR), muscarinic kinase receptor (MuSK) and LDL receptor related protein 4 (Lrp4). The injection of any of these antigens (generated in appendix 1 using animals or commercial or recombinant origin) is used to produce an animal model of the disease and/or to study the pathologic progression/mechanisms of the disease and the symptoms induced in the animals. For example, it has been proven in myasthenia gravis (MG), where the injection of MuSK or AChR develop MG and are already well established animal models for autoimmunity (experimental autoimmune myasthenia gravis or EAMG). For central nervous system (CNS) antigens, active immunization has been performed in some pathologies like Multiple sclerosis (MS) where myelin proteins are injected to develop an inflammation model called experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Denic A. et al., 2013; Mix E. et al., 2010). This give direct evidence and supports the hypothesis that the injection of the antigen will develop the disorder in an animal model. An autoimmune disease can be either T-cell or B-cell mediated (or a combination of both). To determine what the driving pathogenic force is, the immunized animals will be used to isolate antibodies, T-cell and B-cells and each fraction can subsequently be transferred to naïve animals (passive transfer) to test pathogenicity (which is described in

Appendix 3).

The antigen will be obtained from one of the following sources, depending on the state of research:

- a) External sources: electric organ of the *Torpedo californica*, recombinant autoantibodies, *in vitro* systems based on the production of the antigen of interest using eukaryotic cell lines (recombinant DNA in prokaryotic and eukaryotic systems) or any other antigenic SOURCE used to immunize and generate a nervous system autoimmune animal model of interest.
- b) In house generation: as described in Appendix 1, the antigenic and antibody molecules have to be, in some cases, in house generated because they are not commercially available. AChR will be obtained from denervated muscle rat (since *in vitro* methods do not produce enough antigen for this purpose), brain expressed antigens will be obtained from rat brains and primary cell cultures from rat embryos and *in vitro* generated antibodies will be obtained by antigen immunization in rodents. Some of the material will be also used to screen patients' plasma/sera or CSF to identify new pathogenic antigens (e.g. rat brain tissue for immunohistochemistry using patient sera).

The antigen will be administered peripherally (sub cutaneous (s.c.)) to the animal.

The primary outcome is the generation and characterization of autoimmune models targeting the nervous system and will include behavioral (symptomatic), neurological and locomotor tests, followed by post mortem analysis to describe the production of antibodies, T-cells and B-cells and the pathogenic mechanisms of autoantibodies.

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

The immunization varies on the animal model as described above. The frequency is also determined by several parameters like the immunogenicity and stability of the antigen, the severity of the induced disease, etc. with a minimum of a unique immunization at the beginning to a weekly injection until the end of the experiment. Additionally to the antigen, we will use immunogenic reagents to exacerbate the immune reaction since a strong immune response and a break in the tolerance to self-antigens are required to generate an autoimmune model. For this purpose we will use Complete Freund's Adjuvant (CFA) which will be mix with the antigen of interest in an emulsion, injected s.c. in 4 different places in the base of the tail (incomplete FA (IFA) will be used in case of repetitive immunizations (Li, 2004)). CFA will be used to generate the animal models following international guidelines for reproducible and reliable autoimmune models in MG (██████████ et al., 2015) and other models like collagen-induced arthritis (Brand DD. et al., 2007), autoimmune uveitis (Bansal S. et al., 2015), Tourette syndrome animal model (Horning M. and Lipkin W.I., 2010), experimental autoimmune encephalitis (Randohoff R.M., 2012; Denic A. et al., 2013) or experimental allergic encephalomyelitis (Pachner A.R., 2011) among others. The duration of the experiment varies between 6 to 9 weeks.

- a) For the development of a disease, animal models will be generated by a single immunization or weekly immunizations as a maximum frequency, in the same way but studied for up to 9 weeks (chronic model) in case of repetitive immunizations the first immunization will be performed using CFA and the following/s using incomplete FA (IFA) (Li, 2004). During this time, animals will perform different behavioral and neurological tests as described below and will be sacrificed at different time points to analyze pathogenicity and signs of inflammation. Also the blood (obtained from saphenous vein, every 3-10 days maximum, following the NC3R guidelines for blood sampling) will be analyzed for antibody titers, total IgG and antigen specific IgG and leukocyte populations during the disease progression. This will be useful to study progression of the autoimmune disorders induced which can be correlated with behavior, neurologic and locomotor data.

Control groups are required in all experiments. We will include 3 groups of animals:

1. Animals injected with the antigen + CFA; animal model
2. Animals injected with saline + CFA; control 1, animal without the disease
3. Animals injected with saline; control 2, animal without any immunogen agent injected

With this approach we will be able to know the specific effect of the antigen, by analyzing the effect of the antigen and the effect of the CFA. It is also important to define the effect of CFA since this has never been tested before and maybe it enhances the pain and discomfort sensation in the animals. In case pain is tested, animals without any intervention have to be included to have the basal/physiological level of this measurement.

The motor, neurologic and behavioral battery set up will depend on the nature of the disorders. Also, from each animal model, the batch of tests will be selected to answer the questions as accurately as possible. Every antigen will induce a specific group of symptoms. Some examples of which we expect to study with the associated symptoms are depicted in the table below.

Table 1. [Redacted]

[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]	[Redacted]

[Redacted] before. All possible tests have been mentioned in the Table 2 (below). The combination of the tests selected IS disease specific AND is defined according to the pathology and the research question. The choices of the test that we will perform will be based on the latest literature for each pathology reported (Table 1) and on the availability of the tests in our department. It is important to mention that not all the animals in the same experiment will follow the same set of tests, since some of them are incompatible. Some tests have to be performed regularly as described in the Table 2 and others just once, where some others are terminal experiments.

Table 2. Procedures required characterizing neuropsychiatric animal models. Tests are classified according to the main outcome and the character of it: behavior, neurologic and locomotion. A brief description per test and the degree of invasiveness and discomfort has been included.

Procedure/test	Description	Main outcome	Example	Invasive/ non invasive// discomfort	Behavior/ neurologic/ locomotion/ operational
1. Alternating Y-maze (Hughes RN., 2004)	The animal is introduced in the center of a Y-shaped maze with three white opaque arms. The number of arm entries and the percent of alternations are calculated.	Willingness to explore new environments. Cognitive working memory.	Individuals with cognitive deficits perform less alternation compared to wild type (WT) animals due to the deficit in cognitive working memory.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (cognition)
2. Black and white	The animal is introduced	Anxiety and	The preference by	Non invasive	Behavior (affect)

test box (Costall B. et al., 1989)	into a box with bright and dark areas. The preference light/dark areas are measured.	exploratory behavior.	dark areas can be silenced by anxiolytic drugs.	// Mild discomfort (anxiety)	
3. Catwalk (Deacon R.M.J., 2013)	The animal traverses a glass plate voluntarily and the footprints are recorded.	Locomotor activity and nociception.	Minimal physical interference and pain behaviors can be detected and analyzed (different patterns) by this method. Analgesic efficiency can be evaluated.	Non invasive // Mild discomfort	Locomotion
4. Cued and Contextual Fear Conditioning (Curzon P. et al., 2009)	The animal is placed in a box where different expected/unexpected stimulus (light, tone, odor) will be presented. The animal will freeze when an unexpected stimulus is presented. The percentage spent freezing and time for extinction will be measured.	Associative learning and memory (amygdala-hippocampus dependent).	Rodent models with cognitive deficits show less freezing during both cued and context freezing after having been conditioned. Furthermore, they show faster extinction of conditioning compared to WT animals.	Non invasive // Moderate discomfort	Behavior (cognition)
5. Electromyography (EMG) (Osuchowski M.F., et al., 2009)	Different electrodes are located in the paw and in the tail. The time required to transport the electric signal is recorded.	Skeletal muscle electric activity.	In MG rats, EMG is useful to record the degeneration of the muscles and the progression disease.	Invasive// Mild discomfort (under anesthesia, terminal experiment)	Neurologic
6. Elevated zero maze test (Kulkarni SK. et al., 2007)	Animals are displaced in an annular or "X" shape elevated platform with open and enclosed quadrants. The time spent in enclosed areas is measured.	Anxiety.	In rodent with cognitive deficits, spent less time in the enclosed arms compared to WT animals, indicating memory deficits.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect)
7. Encephalography (EEG) (Xie C. et al., 2011)	Brain spontaneous activity is measured and recorded from multiple electrodes placed on the scalp. <u>A video recording is necessary to confirm epileptic seizures.</u>	Electrical brain activity and epileptic seizures.	Epileptic events and encephalopathies can be diagnosed by this method in animal models.	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia)	Neurologic
8. Forced swimming tests (Can A. et al., 2012)	The animal is placed in a cylindrical tank with water (the bottom is not reachable and they can not scape from the container). The time spent trying to escape/swim/float is recorded.	Anhedonia, depressive-like behavior	Anti-depressant therapies can be tested using this technique.	Non invasive // Moderate discomfort (anxiety and stress)	Behavior (affect)
9. Horizontal and	The animal is placed in	Motor function,	The animal get a	Non invasive	Locomotion and

fixed bars (Deacon RMJ. 2013)	the middle of a horizontal suspended bar (with different diameters) where they need to walk without falling. In the fixed bars, the different diameters bars are fixed and they need to go from one end of the stick to the base.	orientation and coordination	composite score: time spent on the bar without falling, capacity to reach the base of the apparatus and the diameter of the bar. Animals with neurological or locomotor issues will have difficulties and fall soon.	// Mild discomfort	neurologic
10. Intubation ██████ et al., 2015)	Artificial ventilation is provided to the animal through a trachea incision, placing a tube connecting to air flow.	Ensure breathing	Electromyography is a procedure where curare is injected, blocking all muscles making artificial ventilation necessary.	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia, terminal experiment)	Operational
11. Morris Water Maze (Vorhees CV. and Williams MT., 2008)	The rodent is placed in a swimming arena where a submerged platform is located in a strategic place. The time spent to learn will determine the spatial learning and later on the time spent to find the platform will be correlated with the reference memory (the arena is divided by 4 quadrants).	Spatial learning and memory hippocampus dependent. Swimming skills	Rodents with cognitive deficits will spend less time in the target quadrant, because they forgot where it was. The swimming speed can also be measured to determine the locomotion status.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (cognition) and locomotion
12. Nerve conductance speed (NCS) (Osuchowski M. et al., 2009; ██████ et al., 2015)	Electrodes are placed in the leg and on the tail of the animal. The time required to receive the stimulus from the emitting and the receiving is recorded and correlated with the nervous and muscle status	Nerve damage and neuropathic measurement	Nerve damage can be measured using this technique for example for sciatic nerve impairment. Neuropathy can be tested also as a drug side effect using this technique	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia)	Neurologic
13. Object recognition task (Leger M. et al., 2013)	Two similar objects are presented to the animal for the first time and the second time one of them is replaced by a new object. Object exploration duration and habituation times can be analyzed.	Cognition and recognition memory	Animals with cognition impairment will spend more time to recognize the constant and the new object.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (cognition)
14. Olfactory function /Smell threshold concentration test (Yang M. et al.,	Animals are exposed to increasing concentrations of menthol diluted in mineral oil and the minimal menthol	Olfactory function and depression like-behavior	A depressive like behavior is related to decreased olfactory function, so animals with depression will	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (affect)

2009; Katzay A. et al., 2014)	concentration that the mouse responds to is recorded. A mouse response is considered positive when it displays a sharp aversive movement away from the source of smell.		need a stronger olfactory stimulus for positive reaction		
15. Open Field Test (Bailey KR. And Crawley JN., 2009)	The animal is placed in a square chamber, divided in areas. A recording system will determine the preference of the animal between the periphery and the central areas. In parallel, distance and speed, rare behaviors, grooming, etc. can be evaluated.	Locomotion, emotional and anxiety.	Rodent models with cognitive deficits or treated with anxiolytic drugs will show reduced time spent in corners due to reduced anxiety.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect) and locomotion
16. Parallel rod floor test (Kamens HM and Crabbe JC., 2007)	The animal is placed in a parallel stainless steel rod with a base plate behind. The animal paws are recoded and the number of times they slip through the parallel metal rods and touches the base plate.	Motor coordination (ataxia) and activity.	In rodent with cognitive deficits, locomotion deficits have been observed.	Non invasive //Mild discomfort	Locomotion
17. Perfusion [redacted] et al., 2010; [redacted] et al., 2015)	The animal is injected in the central venous system with a reagent (PBS or a fixative)/ The liquid is injected in the left atrium and a cut in the right ventricle drain the liquid.	Remove blood and/or preserve the tissue and organs.	Muscles in MG animal models have to be analyzed ab for this, fixed material is necessary because it help to maintain the integrity of the proteins. Brain is another important organ where sometimes the blood has to be removed or the tissue has to be fixed.	Invasive// Mild discomfort (under anesthesia, terminal experiment)	Operational
18. Pre-pulse inhibition (PPI) (Powel SB et al., 2009)	The animal receives a weak prestimulus o prepulse that results in the inhibition of the reaction of the animal after a subsequent strong startling stimulus or pulse (usually acoustic or light stimulus).	Anhedonia, depressive-like behavior	PPI has been used primarily in pharmacological animal models to screen putative antipsychotic medications. It is considered to be one of the most promising neurophysiological indexes for translational research in psychiatry (Hidetoshi T et al.,	Non invasive // Mild discomfort	Behaviour (affect)

			2011).		
19. Rack grabbing test (██████████. et al., 2010; ██████████ et al., 2015)	The animal is held by the tail and a 300g metal rack has to be grabbed repeatedly (5 times with a resting interval of 30s aprox.).	Strength, weakness and fatigability. Depressive-like behaviors.	MG animal models or other muscle impaired models can be graded using this method by the number of repetitions and the time they grab the rack.	Non invasive //Mild discomfort (anxiety)	Locomotion, Behavior (affect)
20. Resident-intruder tests (Koolhaas JM. et al., 2013)	The animal is placed in a box, first with a sterile female and later with a male from a non-aggressive strain. Social interaction and stereotypical aggressive behaviors are recorded and later analyzed by the frequency of these activities.	Social interaction, stress and aggressiveness/violence.	The social and communication skills and the locomotion can be measured in transgenic mice, where the animals presented more violence. Also the drug effect can be studied in terms of clarity and aggressiveness.	Non invasive //Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect) and locomotion
21. Rotarod (Deacon RMJ. 2013)	The animal is placed in a horizontal cylinder (delimitated on the sides). The cylinder rotate at different increasing speeds and the animal have to walk without falling.	Motor function and coordination	The animal gets a composite score: ledge test, hind limb clasping, gait, kyphosis (locomotion) and time spent. Animals with neurological or locomotor issues will have difficulties and fall soon.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Locomotion and neurologic
22. Social interaction test (Kaidanovich-Bejilin O. et al., 2011; Sato A. et al., 2013)	The animal is placed in a 3 chamber cage. After habituation, the preference between an empty/known animal/unknown animal is measured. The activity is recorded and number and time spend in each department counted.	Natural sociability and preference novel sociability.	Many neuropsychiatric disorders are characterized by social behavior and recognition disruption. Other locomotion and cognitive parameters can be recorded.	Non invasive //Mild discomfort	Behavior and locomotion (affect)
23. Spatial Y-maze, X-maze and V-maze spontaneous alternation test (Lainiola M. et al., 2014)	The animal is placed in the connection of a 3 arm maze and the exploring capacity is measured by the number of arm entries/alternation. Different objects can be placed at the end of the arms.	Cognitive deficits, memory, anxiety	Transgenic animals or drug effect can be analyzed in the cognitive level using this method, measuring the willingness of rodents to explore new environments. Memory deficits can be measured also by the time spent to recognize the objects.	Non invasive //Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect/ cognition)
24. Sucrose	The rodent is free to	Anhedonia and	In chronic stress	Non invasive	Behavior (affect)

preference/anhedonia test (Strekalova T. et al., 2004)	choose between a water/sucrose solutions. The % of preference sucrose/liquid consumed is used as criteria (threshold 65%).	depression-like behaviors	animal model, depression like behavior shows the acuteness of the model with a reduction of sucrose consumption.	// Mild discomfort	
25. Tail suspension test (██████████. et al., 2010; ██████████ et al., 2015)	The animal is held by the tail and they need to climb on the top of the hand repeatedly (5 times with a resting interval of 30s approx.).	Strength, weakness, fatigability. Stress and depressive-like behaviors.	In MG rats, this is a parameter used to observe the acuteness of the disease. Animals exposed to tail suspension for longer periods daily develop chronic stress.	Non invasive //Mild discomfort (anxiety)	Locomotion and behavior (affect)
26. Venipuncture	A needle is used to puncture an occluded vessel (saphenous vein or submandibular venous sinus). The blood start dripping and after collecting the required amount, you have to press the area to stop the bleeding.	Obtaining a blood sample.	Blood contains a lot of parameters that can be studied in order to monitor autoimmune state in animal disease models like MG, encephalitis, etc. Drug side effects can also be assessed by blood analysis.	Invasive // Mild discomfort	Operational
27. Von Frey and Hargraves (Krzyzanowska A. And Avedaño C., 2012)	The animal is subjected to different thermic and mechanic increasing intensity stimulus. The maximum intensity the animal can withstand without reaction is recorded as a threshold.	Pain susceptibility/nociception.	Animal models can be tested by this method to assess the susceptibility to pain which reflect their own welfare. Could be an indirect measurement of therapy efficiency or to detect side effects. It also helps to determine the general health.	Non invasive // Moderate discomfort	Behavior (pain)
28. Weight measurement	Animals are placed in a balance and the weight is recorded.	General health.	Weight is a general measurement related with general health, disease progression (for example in MG) and drug side effects.	Non invasive //Mild discomfort	Operational

All animals will undergo A behavioral-neurological-locomotor battery adjusted to the induced disease, varying from 2-15 the amount of tests/procedures per animal distributed along the experiment (██████████. et al., 2011; Planaguma J. et al., 2015).

An example of CNS passive transfer models with cognitive impairment, is the one performed by Planaguma J. and colleagues, where the animals are characterized using the novel object recognition in open field and V-maze task, sucrose preference/anhedonia test, tail suspension and forced swimming tests, black and white and elevated plus maze tests, resident-intruder test and horizontal and vertical activity assessment. The tasks are performed once to weekly frequency. In our case, we have designed a set of tasks based on 5 domains (specified in Table 2), since the literature is quite terse and the models we will develop might not follow the same pathological mechanisms having different impairments. Based on these domains, we have select a first line tests which will be the first ones applied to characterize the

animal model:

- 1) Affect: Elevated zero maze test, sucrose preference test and pre-pulse inhibition
- 2) Cognition: Alternating Y-maze and object recognition task
- 3) Motor: Open field and rotarod
- 4) Pain: Von Frey
- 5) Neurologic: Electroencephalography

After the analysis of the first results, a more specific batch of test will be applied to the specific animal model, focusing on the domains affected. We expect differences in 2-3 domains and we will undertake a maximum of 3 tasks per domain to characterize the animal model in a proper way in those areas where the phenotype is altered (see Table 2). An example of it is the Resident-intruder test or the social interaction, which will introduce more power to an aggressive or abnormal behavior, already observed when the animal is placed in a box with others. The tests will be chosen based on the non-overlapping of outcomes and the non-alteration (bias) of the results because of the application of all of them together. In case those interactions between tests are observed at mid-term evaluation of the results, each group will be subdivided and the animals will follow different set of tasks, reducing in this way the bias.

For the PNS a different battery of task will be applied based on previous experience or recent literature. An example of the batch of tests performed in an active immunization MG model for a drug experiment is (██████████ et al., 2010):

1. Motor: Rack grabbing test and tail suspension test
2. Pain: Von Frey and Hargreaves tests
3. Neurologic: nerve conductance speed and electromyography

Besides the cognition, neurologic and locomotor assessment, some other operational task may be applied to the animal models like general observation (not consider a test/task, since the animals will be checked routinely), venipuncture and weight measurements during the experiment and other terminal tasks like intubation or perfusion at the end of the experiment, depending on the specific purpose of the study.

All the tests/procedures applied to the animals are well established procedures under a standard protocol (Standardized operational protocol; SOP) which will reduce the bias of the experiment, since in these cases, interaction between the different tasks are already described and we will not make these specific set of tests for the experimental animals. In case it is necessary to include tasks that will affect each other because of the research question, the groups will be divided in subgroups which will follow different sets of tests. On the other hand, another measure to reduce the bias is the design of the tests performed in each experiment, which will be defined by the literature available currently before the performance of the experiments and also based on the expertise of people who has large experience in the behavior test. Under their advice, the tests will be chosen following a stress increasing scale throughout the experiment (in example, an open field will be always performed before a forced swimming test). It is important to mention that all observers (minimum of 2 independent researchers) will be blinded to different groups when performing the tasks.

For this appendix the go/ no-go criteria are the following:

1. Animal phenotype

- a) Robust and standard: analysis on the different behavior, neurologic and/or locomotion tasks will be performed as well as *in vitro* analysis defining the levels of different markers involved in autoimmunity like autoantibodies (specific and unspecific), inflammation cells and molecules e.g. plasma cells and cytokines. For standard animal models, the non-reproduction of the symptomatology and other markers is a direct no-go criteria, taking into account the variance between experiments (██████████ et al., 2015). For novel animal models, if no differences equal or higher than 10% between the disease and the control group are found, a no-go decision will be followed. In this case, the experimental conditions of the model will be studied in detail, and changes (e.g. species, gender, route of administration, frequency, dose, adjuvants, etc.) will be implemented to try to generate a robust and standard animal model. If no differences are found after modifying the strategy, we will report the results as a non-successful or non-viable model for the specific antigen of interest.
- b) Severe: the symptomatology of the animal model will be observed and in case of severe discomfort and/or pain because of the intervention procedures (e.g. immunization), analgesic

will be applied and if even using this the animal keep suffering, a no-go decision will be followed as explained in point a). If animals reach humane endpoints (section J), they will be sacrificed.

2. Test battery

After the analysis of the results of the battery tests, a go/no go decision will followed. In case an animal model shows differences in one of the domains and not in the other, the number of tasks assessing this parameter will be increased and the other test removed from the batch. Moreover, some tests included in Table 2 will be performed in case a strange behavior is observed during routine observation. It is important to mention that, the behavioral battery may change based on results generated from the first groups tested (based on a go/no-go decision after a first characterization in case of CNS active immunization models). For example:

- a) When the animal model is new, a characterization of the results in each test will provide an overview of the effect of each antigen specific immunization in the animal model, so a go decision will be followed in this case up to enough reliable data is available.
- b) In case of new animal models when a test has been shown (see previous point a)) not to detect differences between groups using a positive and a negative control, it will be discarded from the behavioral battery for this specific animal model (this indicates that the test for that particular model is not useful (no go decision)).
- c) When the animal model is well characterized and the results from the test are unexpected, showing no differences between the groups, a no-go decision will be followed.

For the postmortem study, CSF and blood will be collected for analysis of different molecule levels (e.g. total immunoglobulin levels and specific isotypes and antigen specific immunoglobulin or other factors affected) and cell populations will be studied as well to see how different immune system related cells and molecules can vary due to the disease. On the other hand, tissues will be collected to be analyzed. Immune related organs – thymus, spleen, lymph nodes, bone marrow –, brain, muscles and other organs which can be affected specifically by the disease developed – intestines, gut, sciatic nerve, liver, kidney, etc.-. For tissue collection, based on the research question to be answered, different treatments can be applied to the tissue, being necessary to include in some experiments perfusion with different reagents (glutaraldehyde, paraformaldehyde, etc.) of the animals to obtain fixed tissue (e.g. for MG, 2% glutaraldehyde perfused muscles are necessary to study the neuromuscular junction structure).

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

The numbers of animals will be kept to a minimum by collaboration with people who have extensive experience in the generation of autoimmune animal models.

The research strategy will be based on the use of the most informative and descriptive test set for each disease model under the advice of experts in the field, own experience and the use of the literature. We will try to include as many tests as possible taking always into account the bias error and also we will avoid superfluous repetitions. As mentioned above, go/no-go decisions will be taken according to the pathology. If no differences are found using a test already reported to show significant differences, the experiment will be halted. In case there is no previous report about the test, the experiment will continue as a characterization (see above paragraph test battery).

We will use the effect size as a quantitative measurement of the strength of the phenotype of the animal model. Taking into account the next assumptions: a very large-huge effect size ($d=1.20-1.40$; Sawilowsky, S. Journal of Modern Applied Statistical Methods, 2009) and a power of 0.80 (Cohen J., Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences, 1988), with an $\alpha=0.05$ for two-tailed and $\alpha=0.025$ for one-tailed, we will need 9-12 animals per group.

As parameters we will use, in active immunization animal models: IgG titers and weight measurements with some phenotype characteristics (in case of CNS, all the tests proposed in the 5 domains that we will perform in the first pilot) to see whether there are differences or not between the animal model and the controls.

B. The animals

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

For this experiment, rodents, including mice and rats will be used. Different species, strain, and genetic background (also WT) animals can be included. The species (3), strain based on the genetic background, gender (2) and age range will be adjusted according to the literature to the most suitable. According to the induced nervous system autoimmune pathology, the onset severity and progression of the disease can vary and also the extension of the model.

- NMJ animal model using AChR is the only model already well established. We will use Lewis female rat, 8-12 weeks of age, are the most susceptible strain and gender for AChR active immunization (██████████ et al., 2015). Another point in favor to females is that the size of the animal is also important since the amounts of antigen required and the doses of drugs are directly correlated with the weight of them. Other antigens presents in the NMJ can be used to generate the animal models. In these cases, we will use at first the study design used for AChR animal model and the recent literature on the topic (currently there is no information available since we did not define the novel antigen yet).
- For other active immunization models, we will follow the literature available (Denic A. et al., 2013) and in case there is none, we will follow the criteria of other CNS autoimmune models (Planaguma J. et al., 2015, Jones M.V. et al., 2012) or other PNS active immunization models like MG ██████████ et al., 2015). The prevalence of the disorder gender specific in the human population can also be taken into account since the last aim of all research proposes are to reach the human level.

For the animal models of active immunization we will generate a maximum of 5 animal models. For these studies the amount needed depends on the purpose of the animal model (behavior, neurological and/or locomotor description, mechanisms of pathogenicity studies, drug test, new therapies implementation, etc.). We expect a max. of 204 individuals (in example, taking into account 4 groups; disease (20 animal) /healthy (12 animal) * condition "X" /control, in triplicate experiments: $((20*2+12*2)*3=192)$ an average of the animal number included in each active immunization models, since the genetic background of the animals, the number of conditions to be tested, etc. can be modified (for example, in case pain tests will be included, a non-immunized control group has to be included, so 12 more animals have to be included or the necessity to divide the groups in 2 subgroups because of the tasks overlapping: for example when a task measuring anxiety and another one measuring cognitive impairment cannot be applied in the same animal because one will interfere with the other and the results will not be reliable). In this calculation we have already taken into account that some animals will have the same conditions but will be sacrificed in different way according to the tissue analysis requirement and the high variability existent in active immunization models. In total we will not use more than 1020 animals for active immunization models ($204*5=1020$ animals).

Summarizing, a total of 1020 animals (816 rats and 204 mice) will be included in the "Active immunization in rodents" appendix.

All animals will be obtained from a registered supplier or a researcher who have specific animal models in case the registered supplier doesn't have it.

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.

Animal models of autoimmune diseases are required to study the *in vivo* pathogenic mechanisms, which will help to understand the procedures underlying the disease. There are no other *in vitro* experimental approaches that can give us this information, because the disease development in this case is very complex and dependent on the interplay of immune system and nervous system. Additionally, we aim to prove that the autoimmune disease can induce neurological and psychiatric symptoms which are difficult to measure in lower organisms.

The number of animals will be kept to the minimum that can give statistical differences by doing power calculations for sample size and implementing go/no-go criteria we further limit the amount of animals used.

Refinement will take place by using anaesthesia and analgesia for the invasive procedures, including pain due to the use of adjuvants during the immunization and the discomfort generated by the development of the pathology. Incomplete FA (IFA) will be used in case that repetitive immunizations are required (Li, 2004).

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

We are going to adapt the accommodation and the care to the need of the animals. To limit animal discomfort; anaesthesia and analgesia will be used to reduce the discomfort of the animals during the invasive procedures, like nerve conductance or for the terminal experiments like electromyography using curare where the animals have to be intubated and receive mechanical ventilation (for more details see Table 1). Animals which are going to follow pain susceptibility test could not be under anesthesia (will not have anesthesia during a certain period before the test is performed). Usually, pain tests are run in the middle of the experiment, enough time after the immunization and before the terminal experiments, so the anesthesia is not interfering in any case. Because of this, if some animal present high discomfort, the subject will be withdrawn (in any case, this is not what we expect, since these specific tests are performed in chronic models and the human endpoints are always taken into account).

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

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.

Animals will be monitored daily. Anaesthetics and analgesics will be used to reduce the pain and discomfort of the animals due to some procedures (immunization, NCS and EMG). In some cases (e.g. when it is important to assess pain as an outcome parameter), pain tests are going to be run during the experiment as a part of the model characterization and can also be used as a welfare measurement (in MG models pain is expected due to the immunization but in CNS models there is no previous data reporting this).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

We can expect adverse effect of the immunization and of the induced disease *per se*, for example, EAMG cause weakness and fatigability (including problems with food intake and difficulties to breathe or the appearance of elephant teeth) and in case of CNS, memory and some neurological and locomotor impaired abilities can be expected, which generate stress as explained more in detail in section A.

There are no adverse effects are expected in relation to the venipuncture or the NCS, neither in the behaviour nor in pain susceptibility tests.

Explain why these effects may emerge.

An unwanted effect could be observed because of immune reaction against the antigen and the adjuvant. The animal will undergo inflammation in the area of injection with possible pain. Pain killers will be administered if necessary. Furthermore, systemic inflammation might occur if the antibodies produced by the animals start reacting with endogenous proteins. Many of these antigens have never been used in rodent models and we cannot know how symptoms differ from the human disease onset and progression.

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

Regular monitoring will prevent and minimize the discomfort since the animals are going to receive pain killer, anaesthetics and/or analgesics in case they are necessary. The immunization site will be checked the days after the intervention to be sure that no complications appear. Humane endpoints will be defined specific for the pathology studied and in case the animal shows a severe discomfort, euthanasia will be performed if the individual reach that status.

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.

Humane endpoints will be applied in case of rapid weight loss (>20% within 3 days without any improvement—some autoimmune models have a transient acute phase of the disease which

spontaneously recovers), severe acute inflammation at the immunization point (untreatable by the definition of the veterinarian). The following endpoints are unlikely for completeness we include them since some phenotypes have never been tested before. These includes prolonged diarrhea (>3 days), coughing, self-induced trauma, icterus and severe ulceration or bleeding (Recognition of pain and distress, Principles of Laboratory Animal Science, 2001).

We expect neurological symptoms related with autoimmune models where the CNS is target. The incapability to perform the behaviour tasks, the inability to eat and drink (recognized by dehydration signs, weight loss and general body condition) or the presence of continuous tremors, status epilepticus or circling (symptoms from what the animal will not recover) are non expected symptoms that, in case of occur, will be taken as a humane endpoint and the animal will be sacrificed.

In case of generalized unexpected severe adverse reaction the experiment will be halted.

Indicate the likely incidence.

The severity of the induced pathology fluctuates since acute or chronic illness can be induced depending on the dose, frequency and duration of the immunization (Lennon V. et al., 1975; ██████████ et al., 2015).

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').

All the animals will experience some degree of discomfort. The intermediate analysis of the behavioral, neurologic and/or locomotion tests cause mild to moderate discomfort. Operational procedures generate mild discomfort in 100% cases, however, immunization evokes moderate discomfort (single immunization with CFA and repetitive immunizations with IFA). Since all the animals will undergo immunization (except the control group for pain tests, which will not have CFA injection), the added discomfort of all tasks is moderate.

References:

Agnieszka Krzyzanowska and Carlos Avendaño. Behavioral testing in rodent models of orofacial neuropathic and inflammatory pain. *Brain Behav.* 2012; 2(5): 678–697.

Andrew R. Pachner. Experimental models of multiple sclerosis. *Current Opinion in Neurology* 2011, 24:291–299

Atsushi Sato, Masashi Mizuguchi, Kazutaka Ikeda. Social interaction test: a sensitive method for examining autism-related behavioral deficits. *Protocol exchange | Community contributed.* 2013: doi:10.1038/protex.2013.046

Bailey KR, Crawley JN. Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5221/>

Bansal S, Barathi VA, Iwata D, Agrawal R. Experimental autoimmune uveitis and other animal models of uveitis: An update. *Indian J Ophthalmol.* 2015 Mar;63(3):211-8. doi: 10.4103/0301-4738.156914.

Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc.* 2007;2(5):1269-75.

Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD. The Mouse Forced Swim Test. *Journal of Visualized Experiments : JoVE.* 2012;(59):3638. doi:10.3791/3638.

Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989; 32(3):777-85.

Curzon P, Rustay NR, Browman KE. Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5223/>

Deacon RMJ. Measuring Motor Coordination in Mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE.* 2013;(75):2609. doi:10.3791/2609.

Denic A., Johnson AJ, Bieber AJ., Warrington AE., Rodriguez M., and Pirko I.. The Relevance of Animal Models in Multiple Sclerosis Research. *Pathophysiology.* 2011; 18(1): 10.

Hidetoshi Takahashi, Ryota Hashimoto, Masao Iwase, Ryouhei Ishii, Yoko Kamio, and Masatoshi Takeda. Prepulse Inhibition of Startle Response: Recent Advances in Human Studies of Psychiatric Disease. *Clin Psychopharmacol Neurosci*. 2011 Dec; 9(3): 102–110. doi: 10.9758/cpn.2011.9.3.102

Hornig M, Lipkin WI. Immune-mediated animal models of Tourette syndrome. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013 Jul;37(6):1120-38. doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.01.007.

Hughes RN, The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. 2004; 28(5):497-505.

Jones MV., Collongues N., de Seze J., Kinoshita M., Nakatsuji Y., Levy M. Review of Animal Models of Neuromyelitis Optica. *Mult Scler Relat Disord*. 2012; 1(4): 174–179.

Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR. Assessment of Social Interaction Behaviors. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 2011;(48):2473. doi:10.3791/2473.

Kamens HM, Crabbe JC. The parallel rod floor test: a measure of ataxia in mice. *Nature protocols* 2007;2(2):277-81. doi:10.1038/nprot.2007.19

Katzav A, Ben-Ziv T, Blank M, Pick CG, Shoenfeld Y, Chapman J. Antibody-specific behavioral effects: Intracerebroventricular injection of antiphospholipid antibodies induces hyperactive behavior while anti-ribosomal-P antibodies induces depression and smell deficits in mice. *Journal of Neuroimmunology*, 2014: 272(1-2), 10–15.

Kirkwood, James and Hubrecht, Robert. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*. Wiley-Blackwell, 2010. p. 29. ISBN 1-4051-7523-0.

Koolhaas JM, Coppens CM, de Boer SF, Buwalda B, Meerlo P, Timmermans PJA. The Resident-intruder Paradigm: A Standardized Test for Aggression, Violence and Social Stress. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 2013;(77):4367. doi:10.3791/4367.

Kulkarni SK1, Singh K, Bishnoi M. Elevated zero maze: a paradigm to evaluate antianxiety effects of drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2007;29(5):343-8.

Lainiola M, Procaccini C, Linden AM. mGluR3 knockout mice show a working memory defect and an enhanced response to MK-801 in the T- and Y-maze cognitive tests. *Behav Brain Res*. 2014: 1 (266) 94-103. doi: 10.1016/j.bbr.2014.03.008.

Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P. Object recognition test in mice. *Nature Protocols*. 2013; (8) 2531–2537.

Lennon VA, Lindstrom JM, Seybold ME. Experimental autoimmune myasthenia: A model of myasthenia gravis in rats and guinea pigs. *J Exp Med* 1975;141(6):1365–1375.

Li H, Zhang YY, Sun YN, Huang XY, Jia YF, Li D. Induction of systemic lupus erythematosus syndrome in BALB/c mice by immunization with active chromatin. *Acta Pharmacol Sin*. 2004; 25(6):807-11.

Marcin F. Osuchowski, James Teener, Daniel Remick, Noninvasive model of sciatic nerve conduction in healthy and septic mice: reliability and normative data. *Muscle Nerve*. 2009; 40(4): 610–616. doi: 10.1002/mus.21284

Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. *Prog Neurobiol*. 2010; 92(3):386-404.

Osuchowski Mf, Teener J, Remick D. Noninvasive model of sciatic nerve conduction in healthy and septic mice: reliability and normative data. *Muscle & nerve*. 2009; 40(4):610-616.

Planaguma, J.; Leypoldt, F.; Mannara, F.; Gutierrez-Cuesta, J.; Martin-Garcia, E.; Aguilar, E.; Titulaer, M.J.; Petit-

Pedrol, M.; Jain, A.; Balice-Gordon, R.; et al. Human N-methyl-d-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain J. Neurol.* 2015, 138, 94–109.

Powell SB1, Zhou X, Geyer MA. Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia. *Behav Brain Res.* 2009 Dec 7;204(2):282-94. doi: 10.1016/j.bbr.2009.04.021.

Richard M Ransohoff. Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nature Neuroscience.* 2012; 15: 1074–1077. doi:10.1038/nn.3168

Robert M.J. Deacon , Measuring Motor Coordination in Mice. *J Vis Exp.* 2013; (75): 2609. doi: 10.3791/2609

Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology.* 2004; 29 (11): 2007-17.

Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols.* 2006;1(2):848-858.

Xie C, Sun J, Qiao W, Lu D, Wei L, Na M, Song Y, Hou X, Lin Z. Administration of simvastatin after kainic acid-induced status epilepticus restrains chronic temporal lobe epilepsy. *PLoS One.* 2011;6(9):e24966. doi: 10.1371/journal.pone.0024966.

Yang M, Crawley JN. Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N Crawley . [et al].* 2009;CHAPTER:Unit-8.24.

Zutphen L. F. M. Van, Baumans V., Beynen A. C.. Recognition of pain and distress .*Principles of Laboratory Animal Science, Revised Edition, 1st Edition, 2001.*

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be sacrificed at the end of the experiment.

The sacrifice of the animals will be done according to the analysis requirements, in this case, based on the tissue characteristics. If fixed tissues have to be studied, perfusion is necessary to preserve the organ/tissue in an optimal way.

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

- 1) This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- 2) A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- 3) For more information, see our website (www.centralecommissiedierproeven.nl).
- 4) 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 |
|--|---------------|---------------------------------|
| | 3 | Passive immunization in rodents |

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 development of passive immunization rodent models for autoimmune mediated diseases that target antigens in the nervous system.

[Redacted content]

- [Redacted content]
- [Redacted content]
- [Redacted content]
- [Redacted content]

[REDACTED]

The primary outcome is the generation of autoimmune models of the nervous system to study the pathogenic mechanisms of the autoimmune disorders affecting the nervous system. The measures will include behavioral (symptomatic), neurological and locomotor tests, followed by post mortem analysis to describe the pathogenic mechanisms of the autoimmune diseases.

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

The immunization varies on the animal model as described above. The frequency is also determined by several parameters like the immunogenicity and stability of the antibodies, the severity of the induced disease, etc. with a minimum of a unique immunization at the beginning to a constant perfusion of the antibody until the end of the experiment. For peripheral injections, i.p. injections are the most common ones unless the antibody target is highly expressed in the peritoneal cavity, being then i.v. administration the optimal. For intrathecal injection, a constant intra-ventricular infusion via a minipump is optimally used. In shorter experiments (<1 week) only one or two intra-ventricular injections would be considered. In case the antibody has to reach the CNS and the injection is peripheral, BBB permeabilization reagents will be used, together with the antibodies, as described above. The immunization site will be checked the days after the intervention to be sure complications will not appear.

Control groups are required in all experiments. We will include a control without the disease (a non-pathogenic antibody is going to be injected instead of the pathogenic antibodies). The control group will be treated equally as the study group, meaning that permeabilize reagents will be also injected to control group if required. In case the study is based on the capacity of the antibody to penetrate the BBB, the study group is composed by 2 groups (antibody with and without the permeabilization), 2 control groups will be required (antibody without permeabilization and permeabilization without antibody).

The motor, neurologic and behavioral battery set up will depend on the nature of the disorders. Also, from each animal model, the batch of tests will be selected to answer the questions as accurately as possible. Every antibody will induce a specific group of symptoms. Some examples of which we expect to study with the associated symptoms are depicted in the table below.

Table 1. [REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]

Animal procedures selected will depend on the purpose of the study as mentioned before. All possible tests have been mentioned in the Table 2 (below). The combination of the tests selected disease specific is defined according to the pathology and the research question. All the choices about the test that we will perform will be based on the latest literature for each pathology reported (Table 1) and on the availability of the tests in our department. It is important to mention that not all the animals in the same experiment will follow the same set of tests, since some of them are incompatible. Some tests have to be performed regularly as described in the Table Y and others just once, where some others are terminal experiments.

Table 2. Procedures required characterizing neuropsychiatric animal models. Tests are classified according to the main outcome and the character of it: behavior, neurologic and locomotion. A brief description per test and the degree of invasiveness and discomfort has been included.

Procedure/test	Description	Main outcome	Example	Invasive/ non invasive// discomfort	Behavior/ neurologic/ locomotion/ operational
1. Alternating Y-maze (Hughes RN., 2004)	The animal is introduced in the center of a Y-shaped maze with three white opaque arms. The number of arm entries and the percent of alternations are calculated.	Willingness to explore new environments. Cognitive working memory.	Individuals with cognitive deficits perform less alternation compared to wild type (WT) animals due to the deficit in cognitive working memory.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (cognition)
2. Black and white test box (Costall B. et al., 1989)	The animal is introduced into a box with bright and dark areas. The preference light/dark areas are measured.	Anxiety and exploratory behavior.	The preference by dark areas can be silenced by anxiolytic drugs.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect)
3. Catwalk (Deacon R.M.J., 2013)	The animal traverses a glass plate voluntarily and the footprints are recorded.	Locomotor activity and nociception.	Minimal physical interference and pain behaviors can be detected and analyzed (different patterns) by this method. Analgesic efficiency can be evaluated.	Non invasive // Mild discomfort	Locomotion

4. Cued and Contextual Fear Conditioning (Curzon P. et al., 2009)	The animal is placed in a box where different expected/unexpected stimulus (light, tone, odor) will be presented. The animal will freeze when an unexpected stimulus is presented. The percentage spent freezing and time for extinction will be measured.	Associative learning and memory (amygdala-hippocampus dependent).	Rodent models with cognitive deficits show less freezing during both cued and context freezing after having been conditioned. Furthermore, they show faster extinction of conditioning compared to WT animals.	Non invasive // Moderate discomfort	Behavior (cognition)
5. Electromyography (EMG) (Osuchowski M.F., et al., 2009)	Different electrodes are located in the paw and in the tail. The time required to transport the electric signal is recorded.	Skeletal muscle electric activity.	In MG rats, EMG is useful to record the degeneration of the muscles and the progression disease.	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia, terminal experiment)	Neurologic
6. Elevated zero maze test (Kulkarni SK. et al., 2007)	Animals are displaced in an annular or "X" shape elevated platform with open and enclosed quadrants. The time spent in enclosed areas is measured.	Anxiety.	In rodent with cognitive deficits, spent less time in the enclosed arms compared to WT animals, indicating memory deficits.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect)
7. Encephalography (EEG) (Xie C. et al., 2011)	Brain spontaneous activity is measured and recorded from multiple electrodes placed on the scalp. A video recording is necessary to confirm epileptic seizures.	Electrical brain activity and epileptic seizures.	Epileptic events and encephalopathies can be diagnosed by this method in animal models.	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia)	Neurologic
8. Forced swimming tests (Can A. et al., 2012)	The animal is placed in a cylindrical tank with water (the bottom is not reachable and they can not scape from the container). The time spent trying to escape/swim/float is recorded.	Anhedonia, depressive-like behavior	Anti-depressant therapies can be tested using this technique.	Non invasive // Moderate discomfort (anxiety and stress)	Behavior (affect)
9. Horizontal and fixed bars (Deacon RMJ. 2013)	The animal is placed in the middle of a horizontal suspended bar (with different diameters) where they need to walk without falling. In the fixed bars, the different diameters bars are fixed and they need to go from one end of the stick to the base.	Motor function, orientation and coordination	The animal get a composite score: time spent on the bar without falling, capacity to reach the base of the apparatus and the diameter of the bar. Animals with neurological or locomotor issues will have difficulties and fall soon.	Non invasive // Mild discomfort	Locomotion and neurologic
10. Intubation	Artificial ventilation is	Ensure breathing	Electromyography is a	Invasive //	Operational

██████ et al., 2015)	provided to the animal through a trachea incision, placing a tube connecting to air flow.		procedure where curare is injected, blocking all muscles making artificial ventilation necessary.	Mild discomfort (under anesthesia, terminal experiment)	
11. Morris Water Maze (Vorhees CV. and Williams MT., 2008)	The rodent is placed in a swimming arena where a submerged platform is located in a strategic place. The time spent to learn will determine the spatial learning and later on the time spent to find the platform will be correlated with the reference memory (the arena is divided by 4 quadrants).	Spatial learning and memory hippocampus dependent. Swimming skills	Rodents with cognitive deficits will spend less time in the target quadrant, because they forgot where it was. The swimming speed can also be measured to determine the locomotion status.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (cognition) and locomotion
12. Nerve conduction speed (NCS) (Osuchowski M. et al., 2009; ████████ et al., 2015)	Electrodes are placed in the leg and on the tail of the animal. The time required to receive the stimulus from the emitting and the receiving is recorded and correlated with the nervous and muscle status	Nerve damage and neuropathic measurement	Nerve damage can be measured using this technique for example for sciatic nerve impairment. Neuropathy can be tested also as a drug side effect using this technique	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia)	Neurologic
13. Object recognition task (Leger M. et al., 2013)	Two similar objects are presented to the animal for the first time and the second time one of them is replaced by a new object. Object exploration duration and habituation times can be analyzed.	Cognition and recognition memory	Animals with cognition impairment will spend more time to recognize the constant and the new object.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (cognition)
14. Olfactory function /Smell threshold concentration test (Yang M. et al., 2009; Katzay A. et al., 2014)	Animals are exposed to increasing concentrations of menthol diluted in mineral oil and the minimal menthol concentration that the mouse responds to is recorded. A mouse response is considered positive when it displays a sharp aversive movement away from the source of smell.	Olfactory function and depression like-behavior	A depressive like behavior is related to decreased olfactory function, so animals with depression will need a stronger olfactory stimulus for positive reaction	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (affect)
15. Open Field Test (Bailey KR. And Crawley JN., 2009)	The animal is placed in a square chamber, divided in areas. A recording system will determine the	Locomotion, emotional and anxiety.	Rodent models with cognitive deficits or treated with anxiolytic drugs will show	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect) and locomotion

	preference of the animal between the periphery and the central areas. In parallel, distance and speed, rare behaviors, grooming, etc. can be evaluated.		reduced time spent in corners due to reduced anxiety.		
16. Parallel rod floor test (Kamens HM and Crabbe JC., 2007)	The animal is placed in a parallel stainless steel rod with a base plate behind. The animal paws are recoded and the number of times they slip through the parallel metal rods and touches the base plate.	Motor coordination (ataxia) and activity.	In rodent with cognitive deficits, locomotion deficits have been observed.	Non invasive // Mild discomfort	Locomotion
17. Perfusion (██████████ et al., 2010; ██████████ et al., 2015)	The animal is injected in the central venous system with a reagent (PBS or a fixative)/ The liquid is injected in the left atrium and a cut in the right ventricle drain the liquid.	Remove blood and/or preserve the tissue and organs.	Muscles in MG animal models have to be analyzed ab for this, fixed material is necessary because it help to maintain the integrity of the proteins. Brain is another important organ where sometimes the blood has to be removed or the tissue has to be fixed.	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia, terminal experiment)	Operational
18. Pre-pulse inhibition (PPI) (Powel SB et al., 2009)	The animal receives a weak prestimulus o prepulse that results in the inhibition of the reaction of the animal after a subsequent strong startling stimulus or pulse (usually acoustic or light stimulus).	Anhedonia, depressive-like behavior	PPI has been used primarily ██████████ in pharmacological ██████████ animal models to screen ██████████ putative antipsychotic ██████████ medications. It is considered to be one of the most promising neurophysiological indexes ██████████ for translational research in ██████████ psychiatry (Hidetoshi T et al., 2011).	Non invasive // Mild discomfort	Behaviour (affect)
19. Rack grabbing test (██████████ et al., 2010; ██████████ et al., 2015)	The animal is held by the tail and a 300g metal rack has to be grabbed repeatedly (5 times with a resting interval of 30s aprox.).	Strength, weakness and fatigability. Depressive-like behaviors.	MG animal models or other muscle impaired models can be graded using this method by the number of repetitions and the time they grab the rack.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Locomotion, Behavior (affect)
20. Resident-intruder tests	The animal is placed in a box, first with a sterile	Social interaction, stress and	The social and communication skills	Non invasive // Mild	Behavior (affect) and locomotion

(Koolhaas JM. et al., 2013)	female and later with a male from a non-aggressive strain. Social interaction and stereotypical aggressive behaviors are recorded and later analyzed by the frequency of these activities.	aggressiveness/violence.	and the locomotion can be measured in transgenic mice, where the animals presented more violence. Also the drug effect can be studied in terms of clarity and aggressiveness.	discomfort (anxiety)	
21. Rotarod (Deacon RMJ. 2013)	The animal is placed in a horizontal cylinder (delimited on the sides). The cylinder rotate at different increasing speeds and the animal have to walk without falling.	Motor function and coordination	The animal get a composite score: ledge test, hind limb clasping, gait, kyphosis (locomotion) and time spent. Animals with neurological or locomotor issues will have difficulties and fall soon.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Locomotion and neurologic
22. Social interaction test (Kaidanovich-Bejilin O. et al., 2011; Sato A. et al., 2013)	The animal is placed in a 3 chamber cage. After habituation, the preference between an empty/known animal/unknown animal is measured. The activity is recorded and number and time spend in each department counted.	Natural sociability and preference novel sociability.	Many neuropsychiatric disorders are characterized by social behavior and recognition disruption. Other locomotion and cognitive parameters can be recorded.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior and locomotion (affect)
23. Spatial Y-maze, X-maze and V-maze spontaneous alternation test (Lainiola M. et al., 2014)	The animal is placed in the connection of a 3 arm maze and the exploring capacity is measured by the number of arm entries/alternation. Different objects can be placed at the end of the arms.	Cognitive deficits, memory, anxiety	Transgenic animals or drug effect can be analyzed in the cognitive level using this method, measuring the willingness of rodents to explore new environments. Memory deficits can be measured also by the time spent to recognize the objects.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect/cognition)
24. Sucrose preference/anhedonia test (Strekalova T. et al., 2004)	The rodent is free to choose between a water/sucrose solutions. The % of preference sucrose/liquid consumed is used as criteria (threshold 65%).	Anhedonia and depression-like behaviors	In chronic stress animal model, depression like behavior shows the acuteness of the model with a reduction of sucrose consumption.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (affect)
25. Tail suspension test (██████████. et al., 2010; ██████████ et al., 2015)	The animal is held by the tail and they need to climb on the top of the hand repeatedly (5 times	Strength, weakness, fatigability. Stress and depressive-	In MG rats, this is a parameter used to observe the acuteness of the disease.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Locomotion and behavior (affect)

	with a resting interval of 30s approx.).	like behaviors.	Animals exposed to tail suspension for longer periods daily develop chronic stress.		
26. Venipuncture	A needle is used to puncture an occluded vessel (saphenous vein or submandibular venous sinus). The blood start dripping and after collecting the required amount, you have to press the area to stop the bleeding.	Obtaining a blood sample.	Blood contains a lot of parameters that can be studied in order to monitor autoimmune state in animal disease models like MG, encephalitis, etc. Drug side effects can also be assessed by blood analysis.	Invasive // Mild discomfort	Operational
27. Von Frey and Hargraves (Krzyzanowska A. And Avedaño C., 2012)	The animal is subjected to different thermic and mechanic increasing intensity stimulus. The maximum intensity the animal can withstand without reaction is recorded as a threshold.	Pain susceptibility/ nociception.	Animal models can be tested by this method to assess the susceptibility to pain which reflect their own welfare. Could be an indirect measurement of therapy efficiency or to detect side effects. It also helps to determine the general health.	Non invasive // Moderate discomfort	Behavior (pain)
28. Weight measurement	Animals are placed in a balance and the weight is recorded.	General health.	Weight is a general measurement related with general health, disease progression (for example in MG) and drug side effects.	Non invasive // Mild discomfort	Operational

[REDACTED]

[REDACTED]

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

[REDACTED]

[REDACTED]

- [REDACTED]
- [REDACTED]
- [REDACTED] nerve conductance speed and electromyography

Besides the cognition, neurologic and locomotor assessment, some other operational task may be applied to the animal models like general observation (not consider a test/task, since the animals will be checked routinely), venipuncture and weight measurements during the experiment and other terminal tasks like intubation or perfusion at the end of the experiment, depending on the specific purpose of the study.

The experiments will be run for shorter periods than active immunization studies (Appendix 2). For example, the passive immunization in MG is terminated 48-72h after induction (Kusner LL, et al., 2015). For other antigens from the CNS such as for NMDAR encephalitis, animals will be sacrificed 5-46 days after immunization (Planaguma J. et al., 2014) or a neuromyelitis optica (NMO) animal model which is injected with antibodies anti-aquaporin-4, which it takes 14 days (Kinoshita M. et al., 2009). Longer experiments studying the chronic pathological role of the antibody will reach maximum 46 days ([REDACTED] et al., 2016 under revision).

All the tests/procedures applied to the animals are well established procedures under a standard protocol (Standardized operational protocol; SOP) which will reduce the bias of the experiment, since in these cases, interaction between the different tasks are already described and we will not make these specific set of tests for the experimental animals. In case it is necessary to include tasks that will affect each other because of the research question, the groups will be divided in subgroups which will follow different sets of tests. On the other hand, another measure to reduce the bias is the design of the tests performed in each experiment, which will be defined by the literature available currently before the performance of the experiments and also based on the expertise of people who has large experience in the behavior test. Under their advice, the tests will be chosen following a stress increasing scale throughout the experiment (in example, an open field will be always performed before a forced swimming test). It is important to mention that all observers (minimum of 2 independent researchers) will be blinded to different groups when performing the tasks.

For this appendix the go/ no-go criteria are the following:

1. Animal phenotype
 - a) Robust and standard: analysis on the different behavior, neurologic and/or locomotion tasks will be performed as well as *in vitro* analysis defining the levels of different markers involved in autoimmunity like autoantibodies (specific and unspecific), inflammation cells and molecules e.g. plasma cells and cytokines. For standard animal models, the non-reproduction of the symptomatology and other markers is a direct no-go criteria, taking into account the variance between experiments. For novel animal models, if no differences equal or higher than 10% between the disease and the control group are found, a no-go decision will be followed. In this case, the experimental conditions of the model will be studied in detail and changes (e.g. species, gender, route of administration, frequency, dose, adjuvants, etc.) will be implemented to try to generate a robust and standard animal model. If no differences are found after modifying the strategy, we will report the results as a non-successful OR NON-VIABLE model for the specific antigen of interest.
 - b) Severe: the symptomatology of the animal model will be observed and in case of severe discomfort and/or pain, because of the intervention procedures (e.g. immunization), analgesic will be applied and if even using this the animal keep suffering, a no-go decision will be followed and as explained in point a), some changes will be implemented.

2. Test battery

After the analysis of the results of the battery tests, a go/no go decision will be followed. In case an animal model shows differences in one of the domains and not in the other, the number of tasks assessing this parameter will be increased and the other test removed from the batch. Moreover, some tests included in Table 2 will be performed in case a strange behavior is observed during routine observation. It is important to mention that, the behavioral battery may change based on results generated from the first groups tested (based on a go/no-go decision after a first characterization in case of CNS active immunization models). For example:

- a) When the animal model is new, a characterization of the results in each test will provide an overview of the effect of each antigen specific immunization in the animal model, so a go decision will be followed in this case up to enough reliable data is available.
- b) In case of new animal models when a test has been shown (see previous point a)) not to detect differences between groups using a positive and a negative control, it will be discarded from the behavioral battery for this specific animal model (this indicates that the test for that particular model is not useful (no go decision)).
- c) When the animal model is well characterized and the results from the test are unexpected, showing no differences between the groups, a no-go decision will be followed.

For the postmortem study, CSF and blood will be collected for analysis of different molecule levels (e.g. total immunoglobulin levels and specific isotypes and antigen specific immunoglobulin or other factors affected) and cell populations will be studied as well to see how different immune system related cells and molecules can vary due to the disease. On the other hand, tissues will be collected to be analyzed. Immune related organs – thymus, spleen, lymph nodes, bone marrow –, brain, muscles and other organs which can be affected specifically by the disease developed – intestines, gut, sciatic nerve, liver, kidney, etc.-. For tissue collection, based on the research question to be answered, different treatments can be applied to the tissue, being necessary to include in some experiments perfusion with different reagents (glutaraldehyde, paraformaldehyde, etc.) of the animals to obtain fixed tissue (e.g. for MG, 2% glutaraldehyde perfused muscles are necessary to study the neuromuscular junction structure). The techniques we are going to use during this study are: cell based assay (CBA), immunohistochemistry (IHQ), immunofluorescent (IF), radioimmunoassay (RIA), ELISA, Western blot/Dot blot, Flow cytometry, polymerase chain reaction (PCR), electron microscopy can be used and are already operational in our group, based on the literature.

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

The numbers of animals will be kept to a minimum by collaboration with people who have extensive experience in the generation of autoimmune animal models.

The research strategy will be based on the use of the most informative and descriptive test set for each disease model under the advice of experts in the field, own experience and the use of the literature. We will try to include as many tests as possible taking always into account the bias error and also we will avoid superfluous repetitions. As mentioned above, go/no-go decisions will be taken according to the pathology. If no differences are found using a test already reported to show significant differences, the experiment will be halted. In case there is no previous report about the test, the experiment will continue as a characterization (see above paragraph test battery).

We will use the effect size as a quantitative measurement of the strength of the phenotype of the animal model. Taking into account the next assumptions: a very large-huge effect size ($d=1.20-1.40$; Sawilowsky, S. Journal of Modern Applied Statistical Methods, 2009) and a power of 0.80 (Cohen J., Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences, 1988), with an $\alpha=0.05$ for two-tailed and $\alpha=0.025$ for one tailed, we will need 9-12 animals per group.

As parameters we will use, in active immunization animal models: IgG titers and weight measurements with some phenotype characteristics (in case of CNS, all the tests proposed in the 5 domains that we will perform in the first pilot) to see whether there are differences or not between the animal model and the controls.

In case of passive transfer animal models, weight measurements and the outcome of the tests performed

to cover the 5 domains will be taking into account.

B. The animals

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

For this experiment, rodents, including mice and rats will be used. Different species, strain, and genetic background (also WT) animals can be included. The specie (3), strain based on the genetic background, gender (2) and age range will be adjusted according to the literature to the most suitable. According to the induced nervous system autoimmune pathology, the onset severity and progression of the disease can vary and also the extension of the model.

It is intended to use wild type animals (with or without LPS/encephalitogenic T-cells injection to permeabilize the BBB), models with and without an impaired BBB (i.e. ApoE^{-/-}) for brain targets and human transgenic models (i.e. epsilon or gamma AChR subunits (AChR ϵ , AChR γ)) for the protein of interest to mimic the human pathology.

Based on previous literature for NDMAR encephalitis model; wild type C57Bl/6 can be used to mimic memory deficits, and anhedonic and depressive-like behaviors but not locomotor or epileptic phenotypes (Planaguma L. et al., 2014).

We have already experience with the MG model using female Lewis rats aged 10-12 weeks, which is suitable to distinguish the clinical characteristics. C57Bl/6J mice are recommended to study regulatory functions (Kusner LL. et al., 2015).

In general, we will use adult animals for experiments. However, it is known that many factors from the mother can affect the fetus. Antibodies are an example of these molecules that can cross the placental membrane and affect the fetus, even when the mother does not have symptoms, since the antibodies can target only fetal antigens, such as AChR γ . This has been investigated in autism spectrum disorder, where the mothers from autistic children showed a specific band against fetal brain but not against adult brain, meaning that the autoantibodies transferred by the mothers can recognize the fetal proteins, affecting the child. However, these bands were not found in those mothers with normal children, showing the specificity (Braunschweig D. et al., 2008). This can be also the case of other neuropsychiatric disorders like schizophrenia or bipolar disorder, among others. Because of this, we would like to include pregnant animals to study placenta transfer of antibodies and effects of those antibodies on the offspring viability and on the fetus/neonate.

For the animal models of passive immunization we will generate a maximum of 8 animal models (defined by the time period of 5 years). An estimated distribution can be: 2 animal studies for MG (PTMG), 5 CNS autoantibody studies and 1 model generated with autoantibodies generated *in vivo* (Appendix 1) but since the source of the autoantibodies is mainly from patients, is completely dependent on this. For these studies we will need about 30 animals per group (passive transfer autoimmune models are more robust since autoantibodies are directly administrated to the animal) and the same amounts of control animals. When studying the role of the BBB, there will be 4 study groups consisting of:

1. Disrupted BBB – pathogenic immunoglobulin
2. Disrupted BBB – nonpathogenic immunoglobulin
3. Non disrupted BBB (wild type) – pathogenic immunoglobulin
4. Non disrupted BBB (wild type) – nonpathogenic immunoglobulin

For the development of all animal models, using a maximum of 8 antigens, this will be a total maximum of 960 animals (30*4*8=960). Likely, we will be able to reduce these numbers by testing different autoantibody targets at the same time. For example, we expect to study AMPAR, GABA_BR and NMDAR (common outcome parameters) which could all be injected in parallel and thereby we would only need one control group for the 3 antigens. Also, some control group can be saved in case we want to compare the incidence of the BBB disrupted models in the pathology, since the non disrupted groups can be shared in this case.

In this calculation we have already taken into account that some animals will have the same conditions but will be sacrificed in different way according to the tissue analysis requirement and the high variability existent in passive immunization models.

Summarizing, a total of 960 animals (600 rats and 360 mice) will be included in the "Passive immunization in rodents" appendix.

All animals will be obtained from a registered supplier or a researcher who have specific animal models in case the registered supplier doesn't have it.

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.

Animal models of autoimmune diseases are required to study the *in vivo* pathogenic mechanisms, which will help to understand the procedures underlying the disease. Autoantibodies from a specific patient can be individually studied, increasing the personification of the pathogenic tracks in each patient and prove that the autoantibodies are the cause of the pathology, which is difficult to measure in lower organisms. Increasing the knowledge in this area will help the clinicians to apply more efficient treatments to the patients and to test these drugs, also *in vivo* experiments using the disease model are required. There are no other *in vitro* experimental approaches that can give us this information.

The number of animals will be keep to the minimum that can give statistical differences by combining different autoantibodies with similar outcomes and sharing the control groups as explained above. By doing power calculations for sample size and implementing go/no-go criteria we further limit the amount of animals used.

Refinement will take place by using anaesthesia and analgesia for the invasive procedures.

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

We are going to adapt the accommodation and the care to the need of the animals. To limit animal discomfort; anaesthesia and analgesia will be used to reduce the discomfort of the animals during the invasive procedures, like nerve conductance or for the terminal experiments like electromyography using curare where the animals have to be intubated (for more details see Table 1). Animals which are going to follow pain susceptibility test could not be under anesthesia (will not have anesthesia during a certain period before the test is performing (usually pain tests are run in the middle of the experiment, time enough after the immunization and before the terminal experiments, so the anesthesia is not interfere in any case). Because of this, if some animal present high discomfort, the subject will be withdrawn (in any case, this is not what we expect, since these specific tests are performed in chronic models and the humane endpoints are always took into account).

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

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.

Animals will be monitored daily. Anaesthetics and analgesics will be used to reduce the pain and discomfort of the animals due to some procedures (intra ventricular injection, NCS and EMG). Pain tests are going to be run during the experiment as a part of the model characterization or drug side effects and can be also used as a welfare measurement. No analgesics or anaesthetics will be used in normal procedures like blood extraction or neurological, motor or behaviour assesment/tests.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

All the animal models developed by passive immunization will develop a phenotype of moderate discomfort or in some cases will develop mild discomfort that will progress to moderate discomfort. We observe and test the animals daily, which help us to describe the clinical status and the progression of the disorder. When animals reach humane endpoints, they are sacrificed to avoid extra suffering, which will be translated to a severe phenotype.

We can expect adverse effect of the immunization (infections in case of constant infusion through a pump, inflammation in the immunization site, immune system hyperactivity) and the induced disease *per se* due to the pathogenic mechanisms developed (the characteristics symptoms from each disease, i.e. weakness and fatigability in MG and stress, cognitive impairment and seizures in CNS models). Other aspects compromising the welfare of the animals is the *i.p.* injection, which increases the risk of peritonitis and serous fluid production.

There are no adverse effects are expected in relation to the venipuncture or the NCS, neither in the

behaviour nor in pain susceptibility tests.

Explain why these effects may emerge.

An unwanted effect could be observed because of immune reaction against the antigen and the permeabilizing agent. The animal will undergo inflammation in the area of injection with possible pain. Pain killers will be administered if necessary. Furthermore, systemic inflammation might occur if the antibodies start reacting with unspecific endogenous proteins. Many of these antigens have never been used in rodent models and we cannot know how symptoms differ from the human condition.

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

The severity of the induced pathology fluctuates since acute illness can be induced depending on the dose, frequency and duration of the immunization. [REDACTED]

[REDACTED]

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.

Humane endpoints will be applied in case of rapid weight loss (>20% within 3 days without any improvement), severe acute inflammation at the immunization point (untreatable by the definition of the veterinarian). The following endpoints are unlikely for completeness we include them since some phenotypes have never been tested before. These includes prolonged diarrhea (>3 days), coughing, self-induced trauma, icterus and severe ulceration or bleeding (Recognition of pain and distress, Principles of Laboratory Animal Science, 2001).

We expect neurological symptoms related with autoimmune models where the CNS is target. The incapability to perform the behaviour tasks, the inability to eat and drink (recognized by dehydration signs, weight loss and general body condition) or the presence of continuous tremors, status epilepticus or circling (symptoms from what the animal will not recover) are non expected symptoms that, in case of occur, will be taken as a humane endpoint and the animal will be sacrificed.

In case of generalized unexpected severe adverse reaction the experiment will be halted.

Indicate the likely incidence.

The severity of the induced pathology fluctuates since acute illness can be induced depending on the dose, frequency and duration of the immunization. All animals will be sacrificed when the disease is more acute, "full blown" to study the pathological mechanisms in a severe situation, which are usually time short time periods. An example of MG passive model, where in an experiment silencing an associated protein to the neuromuscular junction by [REDACTED] et al., no animal had to be sacrificed before the end of the experiment (max. 72h after immunization). However, an example of the CNS is the work run by Planaguma and colleagues, where the animals had a constant i.v. infusion to reproduce a chronic psychiatric disorder, any of them reach the humane endpoints before the end of the experiment (max. 42 days).

There is no literature available about the percentage of animals that will reach humane endpoints in the few experiments that have been performed. We predict a similar percentage of animals reaching humane endpoints, 0-5% as mentioned in appendix 2, since the targets are the same. However, it is important to mention, that animals will not build the immune response, since they will already receive the antibodies. Because of all these evidences, we expect a reduced percentage of animals reaching the 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').

All the animals will experience some degree of discomfort. The intermediate analysis of the behavioral, neurologic and/or locomotion tests cause mild to moderate discomfort. Operational procedures generate mild discomfort in 100% cases, however, immunization evokes moderate discomfort. Since all the animals will undergo immunization (except the control group for pain tests), the added discomfort of all tasks is moderate.

References:

Agnieszka Krzyzanowska and Carlos Avendaño. Behavioral testing in rodent models of orofacial neuropathic and inflammatory pain. *Brain Behav.* 2012; 2(5): 678–697. doi: 10.1002/brb3.85

Atsushi Sato, Masashi Mizuguchi, Kazutaka Ikeda. Social interaction test: a sensitive method for examining autism-related behavioral deficits. *Protocol exchange | Community contributed.* 2013: doi:10.1038/protex.2013.046

Bailey KR, Crawley JN. Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5221/>

Bradl, M., Misu, T., Takahashi, T., Watanabe, M., Mader, S., Reindl, M., Lassmann, H. Neuromyelitis optica: Pathogenicity of patient immunoglobulin in vivo. *Annals of Neurology.* 2009; 66(5), 630–643.

Braunschweig D, Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Croen LA, Pessah IN, Van de Water J. Autism: maternally derived antibodies specific for fetal brain proteins. *Neurotoxicology.* 2008 Mar;29(2):226-31.

Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD. The Mouse Forced Swim Test. *Journal of Visualized Experiments : JoVE.* 2012;(59):3638. doi:10.3791/3638.

Chang, E. H., Volpe, B. T., Mackay, M., Aranow, C., Watson, P., Kowal, C., Diamond, B.. Selective Impairment of Spatial Cognition Caused by Autoantibodies to the N-Methyl-d-Aspartate Receptor. *EBioMedicine.* 2015; 2(7), 755–764

Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989; 32(3):777-85.

Curzon P, Rustay NR, Browman KE. Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5223/>

Deacon RMJ. Measuring Motor Coordination in Mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE.* 2013;(75):2609. doi:10.3791/2609.

Denic A., Johnson AJ, Bieber AJ., Warrington AE., Rodriguez M., and Pirko I.. The Relevance of Animal Models in Multiple Sclerosis Research. *Pathophysiology.* 2011; 18(1): 10.

[REDACTED]

Hidetoshi Takahashi, Ryota Hashimoto, Masao Iwase, Ryouhei Ishii, Yoko Kamio, and Masatoshi Takeda. Prepulse Inhibition of Startle Response: Recent Advances in Human Studies of Psychiatric Disease *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2011 Dec; 9(3): 102–110. doi: 10.9758/cpn.2011.9.3.102

Hughes RN, The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. 2004; 28(5):497-505.

Jones MV., Collongues N., de Seze J., Kinoshita M., Nakatsuji Y., Levy M. Review of Animal Models of Neuromyelitis Optica. *Mult Scler Relat Disord*. 2012; 1(4): 174–179.

Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR. Assessment of Social Interaction Behaviors. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. 2011;(48):2473. doi:10.3791/2473.

Kamens HM, Crabbe JC. The parallel rod floor test: a measure of ataxia in mice. *Nature protocols* 2007;2(2):277-81. doi:10.1038/nprot.2007.19

Katzav A, Ben-Ziv T, Blank M, Pick CG, Shoenfeld Y, Chapman J. Antibody-specific behavioral effects: Intracerebroventricular injection of antiphospholipid antibodies induces hyperactive behavior while anti-ribosomal-P antibodies induces depression and smell deficits in mice. *Journal of Neuroimmunology*, 2014: 272(1-2), 10–15.

Kinoshita M, Nakatsuji Y, Kimura T, Moriya M, Takata K, Okuno T, Kumanogoh A, Kajiyama K, Yoshikawa H, Sakoda S. Neuromyelitis optica: Passive transfer to rats by human immunoglobulin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 4;386(4):623-7.

Kirkwood, James and Hubrecht, Robert. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*. Wiley-Blackwell, 2010. p. 29. ISBN 1-4051-7523-0.

Koolhaas JM, Coppens CM, de Boer SF, Buwalda B, Meerlo P, Timmermans PJA. The Resident-intruder Paradigm: A Standardized Test for Aggression, Violence and Social Stress. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. 2013;(77):4367. doi:10.3791/4367.

Kulkarni SK1, Singh K, Bishnoi M. Elevated zero maze: a paradigm to evaluate antianxiety effects of drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2007;29(5):343-8.

Lainioli M, Procaccini C, Linden AM. mGluR3 knockout mice show a working memory defect and an enhanced response to MK-801 in the T- and Y-maze cognitive tests. *Behav Brain Res*. 2014: 1 (266) 94-103. doi: 10.1016/j.bbr.2014.03.008.

Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P. Object recognition test in mice. *Nature Protocols*. 2013; (8) 2531–2537. doi:10.1038/nprot.2013.155

Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. *Prog Neurobiol*. 2010; 92(3):386-404.

Osuchowski Mf, Teener J, Remick D. Noninvasive model of sciatic nerve conduction in healthy and septic mice: reliability and normative data. *Muscle & nerve*. 2009; 40(4):610-616. doi:10.1002/mus.21284.

Planaguma, J.; Leypoldt, F.; Mannara, F.; Gutierrez-Cuesta, J.; Martin-Garcia, E.; Aguilar, E.; Titulaer, M.J.; Petit-Pedrol, M.; Jain, A.; Balice-Gordon, R.; et al. Human N-methyl-d-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain J. Neurol*. 2015, 138, 94–109.

Powell SB1, Zhou X, Geyer MA. Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia. *Behav Brain Res*. 2009 Dec 7;204(2):282-94. doi: 10.1016/j.bbr.2009.04.021.

Robert M.J. Deacon , Measuring Motor Coordination in Mice. *J Vis Exp.* 2013; (75): 2609. doi: 10.3791/2609

Sommer, C., Weishaupt, A., Brinkhoff, J., Biko, L., Wessig, C., Gold, R., & Toyka, K. V.. Paraneoplastic stiff-person syndrome: Passive transfer to rats by means of IgG antibodies to amphiphysin. *Lancet.* 2005; 365(9468), 1406–1411.

Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology.* 2004; 29 (11): 2007-17.

Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols.* 2006;1(2):848-858. doi:10.1038/nprot.2006.116.

Xie C, Sun J, Qiao W, Lu D, Wei L, Na M, Song Y, Hou X, Lin Z. Administration of simvastatin after kainic acid-induced status epilepticus restrains chronic temporal lobe epilepsy. *PLoS One.* 2011;6(9):e24966. doi: 10.1371/journal.pone.0024966.

Yang M, Crawley JN. Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N Crawley . [et al].* 2009;CHAPTER:Unit-8.24. doi:10.1002/0471142301.ns0824s48.

Zutphen L. F. M. Van, Baumans V., Beynen A. C.. Recognition of pain and distress .Principles of Laboratory Animal Science, Revised Edition, 1st Edition, 2001.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be sacrificed at the end of the experiment if no adverse events happen.

The sacrifice of the animals will be done according to the analysis requirements, in this case, based on the tissue characteristics. If fixed tissues have to be studied, perfusion is necessary to preserve the organ/tissue in an optimal way. Otherwise, normal sacrifice methods (cervical dislocation) will be used.

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'. 10700
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Maastricht University
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 4 | Therapy efficacy and side effect in nervous system autoimmune models |
- 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 application of treatments in a prevention (starting before the disease appears, usually at the same time of the immunization) or therapeutic regimen. The diseases developed are based in nervous system autoimmune disorders, central and peripheral, developed in rodents as described in Appendix 2 and Appendix 3, by active and passive immunization.

The primary outcomes parameters are at two levels: *in vivo* and postmortem analysis.

1. The *in vivo* measures will give information on behavior neurologic and motor status of the animals. The battery of tests used will vary depending on the autoimmune disease model, but the characterization of all the models will be based in behavior (memory, anxiety, etc.), neurologic (electromyography (EMG), nerve conductance speed (NCS)) and locomotion (motor abilities, weakness, fatigue, etc.). This set of tests allows us to better describe the animal status (see brackets in list below).
2. The analysis of the material from the animal models obtained postmortem will be used to assess the biochemical and molecular level of the disease progression and explore the changes after treatment.

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

Therapies modulating the immune system are going to be tested in different nervous system autoimmune disease animal model described in Appendix 1 and 2. Chemical components with autoimmune pathways modulator effect [redacted] et al., 2010), antibodies targeting molecules of the

nervous system (Stevens et al., under preparation), cells playing a role in the mechanisms and genetic material (DNA or RNA) (██████████ et al., 2009, ██████████ et al., 2016) changing the mechanism of some molecules, essential in the autoimmune diseases, are some examples of the possible therapies that can be applied in this project.

The administration via (s.c. and i.p. are the most common used and electroporation for genetic material using viral or non-viral vehicles), frequency, concentrations and amount of the drugs will be adjusted to the disease model (chronic or acute) and the drug used, based on the reported literature. In case no previous studies have been reported, different administration via and concentrations will be tested in a pilot study to define the optimal parameters (kinetic and chemodynamic properties of the drug will be taken into account) to have the most effective conditions. The treatment efficacy will be assessed to see whether there is a therapeutic window where the treatment is more effective, depending on the disease developed (acute or chronic) and the therapy agent administrated (e.g. in MG rat developed by active immunization, the therapeutic window goes from 4-8 weeks).

To evaluate the efficacy and the side effects of the drugs for the treatment, behavioral, neurological and locomotor tests will be performed in the animal model groups defined in advance and its controls (animals injected with vehicle like saline) (controls of the animal model are also always included to detect the effect of the drug on healthy animals). The outcomes of these tests in the different groups will allow us to assess whether a drug is effective in halting or improving the clinical symptoms of the pathology studied, and therefore provide a stronger translational potential than just analyzing the effect of the drugs using only outcomes from tissue. The animals will undergo the tests regularly (unless they can only be performed once –e.g. EMG) to have different time point data, where a progression of the pathology and drug effect can be studied. Usually, drug studies are performed in chronic disease models to see the progression of the disorder and the effect of the therapy over time and to characterize and had as much information as possible, regular tests are required, like blood samples (██████████ et al., 2010).

Table 1. Procedures required characterizing neuropsychiatric animal models. Tests are classified according to the main outcome and the character of it: behavior, neurologic and locomotion. A brief description per test and the degree of invasiveness and discomfort has been included.

Procedure/test	Description	Main outcome	Example	Invasive/ non invasive// discomfort	Behavior/ neurologic/ locomotion/ operational
1. Alternating Y-maze (Hughes RN., 2004)	The animal is introduced in the center of a Y-shaped maze with three white opaque arms. The number of arm entries and the percent of alternations are calculated.	Willingness to explore new environments. Cognitive working memory.	Individuals with cognitive deficits perform less alternation compared to wild type (WT) animals due to the deficit in cognitive working memory.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (cognition)
2. Black and white test box (Costall B. et al., 1989)	The animal is introduced into a box with bright and dark areas. The preference light/dark areas are measured.	Anxiety and exploratory behavior.	The preference by dark areas can be silenced by anxiolytic drugs.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect)
3. Catwalk (Deacon R.M.J., 2013)	The animal traverses a glass plate voluntarily and the footprints are recorded.	Locomotor activity and nociception.	Minimal physical interference and pain behaviors can be detected and analyzed (different patterns) by this method. Analgesic efficiency can be evaluated.	Non invasive // Mild discomfort	Locomotion

4. Cued and Contextual Fear Conditioning (Curzon P. et al., 2009)	The animal is placed in a box where different expected/unexpected stimulus (light, tone, odor) will be presented. The animal will freeze when an unexpected stimulus is presented. The percentage spent freezing and time for extinction will be measured.	Associative learning and memory (amygdala-hippocampus dependent).	Rodent models with cognitive deficits show less freezing during both cued and context freezing after having been conditioned. Furthermore, they show faster extinction of conditioning compared to WT animals.	Non invasive // Moderate discomfort	Behavior (cognition)
5. Electromyography (EMG) (Osuchowski M.F., et al., 2009)	Different electrodes are located in the paw and in the tail. The time required to transport the electric signal is recorded.	Skeletal muscle electric activity.	In MG rats, EMG is useful to record the degeneration of the muscles and the progression disease.	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia, terminal experiment)	Neurologic
6. Elevated zero maze test (Kulkarni SK. et al., 2007)	Animals are displaced in an annular or "X" shape elevated platform with open and enclosed quadrants. The time spent in enclosed areas is measured.	Anxiety.	In rodent with cognitive deficits, spent less time in the enclosed arms compared to WT animals, indicating memory deficits.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect)
7. Encephalography (EEG) (Xie C. et al., 2011)	Brain spontaneous activity is measured and recorded from multiple electrodes placed on the scalp. A video recording is necessary to confirm epileptic seizures.	Electrical brain activity and epileptic seizures.	Epileptic events and encephalopathies can be diagnosed by this method in animal models.	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia)	Neurologic
8. Forced swimming tests (Can A. et al., 2012)	The animal is placed in a cylindrical tank with water (the bottom is not reachable and they can not scape from the container). The time spent trying to escape/swim/float is recorded.	Anhedonia, depressive-like behavior	Anti-depressant therapies can be tested using this technique.	Non invasive // Moderate discomfort (anxiety and stress)	Behavior (affect)
9. Horizontal and fixed bars (Deacon RMJ. 2013)	The animal is placed in the middle of a horizontal suspended bar (with different diameters) where they need to walk without falling. In the fixed bars, the different diameters bars are fixed and they need to go from one end of the stick to the base.	Motor function, orientation and coordination	The animal get a composite score: time spent on the bar without falling, capacity to reach the base of the apparatus and the diameter of the bar. Animals with neurological or locomotor issues will have difficulties and fall soon.	Non invasive // Mild discomfort	Locomotion and neurologic
10. Intubation	Artificial ventilation is	Ensure breeding	Electromyography is a	Invasive //	Operational

(██████ et al., 2015)	provided to the animal through a trachea incision, placing a tube connecting to air flow.		procedure where curare is injected, blocking all muscles making artificial ventilation necessary.	Mild discomfort (under anesthesia, terminal experiment)	
11. Morris Water Maze (Vorhees CV. and Williams MT., 2008)	The rodent is placed in a swimming arena where a submerged platform is located in a strategic place. The time spent to learn will determine the spatial learning and later on the time spent to find the platform will be correlated with the reference memory (the arena is divided by 4 quadrants).	Spatial learning and memory hippocampus dependent. Swimming skills	Rodents with cognitive deficits will spend less time in the target quadrant, because they forgot where it was. The swimming speed can also be measured to determine the locomotion status.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (cognition) and locomotion
12. Nerve conduction speed (NCS) (Osuchowski M. et al., 2009; ████████ et al., 2015)	Electrodes are placed in the leg and on the tail of the animal. The time required to receive the stimulus from the emitting and the receiving is recorded and correlated with the nervous and muscle status	Nerve damage and neuropathic measurement	Nerve damage can be measured using this technique for example for sciatic nerve impairment. Neuropathy can be tested also as a drug side effect using this technique	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia)	Neurologic
13. Object recognition task (Leger M. et al., 2013)	Two similar objects are presented to the animal for the first time and the second time one of them is replaced by a new object. Object exploration duration and habituation times can be analyzed.	Cognition and recognition memory	Animals with cognition impairment will spend more time to recognize the constant and the new object.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (cognition)
14. Olfactory function /Smell threshold concentration test (Yang M. et al., 2009; Katzay A. et al., 2014)	Animals are exposed to increasing concentrations of menthol diluted in mineral oil and the minimal menthol concentration that the mouse responds to is recorded. A mouse response is considered positive when it displays a sharp aversive movement away from the source of smell.	Olfactory function and depression like-behavior	A depressive like behavior is related to decreased olfactory function, so animals with depression will need a stronger olfactory stimulus for positive reaction	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (affect)
15. Open Field Test (Bailey KR. And Crawley JN., 2009)	The animal is placed in a square chamber, divided in areas. A recording system will determine the	Locomotion, emotional and anxiety.	Rodent models with cognitive deficits or treated with anxiolytic drugs will show	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect) and locomotion

	preference of the animal between the periphery and the central areas. In parallel, distance and speed, rare behaviors, grooming, etc. can be evaluated.		reduced time spent in corners due to reduced anxiety.		
16. Parallel rod floor test (Kamens HM and Crabbe JC., 2007)	The animal is placed in a parallel stainless steel rod with a base plate behind. The animal paws are recoded and the number of times they slip through the parallel metal rods and touches the base plate.	Motor coordination (ataxia) and activity.	In rodent with cognitive deficits, locomotion deficits have been observed.	Non invasive // Mild discomfort	Locomotion
17. Perfusion (██████████ et al., 2010; ██████████ et al., 2015)	The animal is injected in the central venous system with a reagent (PBS or a fixative)/ The liquid is injected in the left atrium and a cut in the right ventricle drain the liquid.	Remove blood and/or preserve the tissue and organs.	Muscles in MG animal models have to be analyzed ab for this, fixed material is necessary because it help to maintain the integrity of the proteins. Brain is another important organ where sometimes the blood has to be removed or the tissue has to be fixed.	Invasive // Mild discomfort (under anesthesia, terminal experiment)	Operational
18. Pre-pulse inhibition (PPI) (Powel SB et al., 2009)	The animal receives a weak prestimulus or prepulse that results in the inhibition of the reaction of the animal after a subsequent strong startling stimulus or pulse (usually acoustic or light stimulus).	Anhedonia, depressive-like behavior	PPI has been used primarily in pharmacological animal models to screen putative antipsychotic medications. It is considered to be one of the most promising neurophysiological indexes for translational research in psychiatry (Hidetoshi T et al., 2011).	Non invasive // Mild discomfort	Behaviour (affect)
19. Rack grabbing test (██████████ et al., 2010; ██████████ et al., 2015)	The animal is held by the tail and a 300g metal rack has to be grabbed repeatedly (5 times with a resting interval of 30s aprox.).	Strength, weakness and fatigability. Depressive-like behaviors.	MG animal models or other muscle impaired models can be graded using this method by the number of repetitions and the time they grab the rack.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Locomotion, Behavior (affect)
20. Resident-intruder tests	The animal is placed in a box, first with a sterile	Social interaction, stress and	The social and communication skills	Non invasive // Mild	Behavior (affect) and locomotion

(Koolhaas JM. et al., 2013)	female and later with a male from a non-aggressive strain. Social interaction and stereotypical aggressive behaviors are recorded and later analyzed by the frequency of these activities.	aggressiveness/violence.	and the locomotion can be measured in transgenic mice, where the animals presented more violence. Also the drug effect can be studied in terms of clarity and aggressiveness.	discomfort (anxiety)	
21. Rotarod (Deacon RMJ. 2013)	The animal is placed in a horizontal cylinder (delimited on the sides). The cylinder rotate at different increasing speeds and the animal have to walk without falling.	Motor function and coordination	The animal get a composite score: ledge test, hind limb clasping, gait, kyphosis (locomotion) and time spent. Animals with neurological or locomotor issues will have difficulties and fall soon.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Locomotion and neurologic
22. Social interaction test (Kaidanovich-Bejilin O. et al., 2011; Sato A. et al., 2013)	The animal is placed in a 3 chamber cage. After habituation, the preference between an empty/known animal/unknown animal is measured. The activity is recorded and number and time spend in each department counted.	Natural sociability and preference novel sociability.	Many neuropsychiatric disorders are characterized by social behavior and recognition disruption. Other locomotion and cognitive parameters can be recorded.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior and locomotion (affect)
23. Spatial Y-maze, X-maze and V-maze spontaneous alternation test (Lainiola M. et al., 2014)	The animal is placed in the connection of a 3 arm maze and the exploring capacity is measured by the number of arm entries/alternation. Different objects can be placed at the end of the arms.	Cognitive deficits, memory, anxiety	Transgenic animals or drug effect can be analyzed in the cognitive level using this method, measuring the willingness of rodents to explore new environments. Memory deficits can be measured also by the time spent to recognize the objects.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Behavior (affect/cognition)
24. Sucrose preference/anhedonia test (Strekalova T. et al., 2004)	The rodent is free to choose between a water/sucrose solutions. The % of preference sucrose/liquid consumed is used as criteria (threshold 65%).	Anhedonia and depression-like behaviors	In chronic stress animal model, depression like behavior shows the acuteness of the model with a reduction of sucrose consumption.	Non invasive // Mild discomfort	Behavior (affect)
25. Tail suspension test (██████ et al., 2010; ██████ et al., 2015)	The animal is held by the tail and they need to climb on the top of the hand repeatedly (5 times	Strength, weakness, fatigability. Stress and depressive-	In MG rats, this is a parameter used to observe the acuteness of the disease.	Non invasive // Mild discomfort (anxiety)	Locomotion and behavior (affect)

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

All the tests/procedures applied to the animals are well established procedures under a standard protocol (Standardized operational protocol; SOP) which will reduce the bias of the experiment, since in these cases, interaction between the different tasks are already described and we will not make these specific set of tests for the experimental animals. In case it is necessary to include tasks that will affect each other because of the research question, the groups will be divided in subgroups which will follow different sets of tests. On the other hand, another measure to reduce the bias is the design of the tests performed in each experiment, which will be defined by the literature available currently before the performance of the experiments and also based on the expertise of people who has large experience in the behavior test. Under their advice, the tests will be chosen following a stress increasing scale throughout the experiment (in example, an open field will be always performed before a forced swimming test). It is important to mention that all observers (minimum of 2 independent researchers) will be blinded to different groups when performing the tasks.

For this appendix the go/ no-go criteria are the following:

- a) Robust and standard: analysis on the different behavior, neurologic and/or locomotion tasks will be performed and *in vitro* analysis as well, definitive the levels of different markers involved in autoimmunity like autoantibodies (specific and unspecific), inflammation molecules and cytokines. For standard animal models, the non-reproducibility of the symptomatology and other markers is a direct no-go criteria, taking into account the variance between experiments. For novel animal models, if no statistically significant differences between the disease and the control group are found, a no-go decision will be followed.
- b) Effectiveness: animals administered with the therapeutic drug has to show an improvement of, at least, 10% when compared with the controls. If this is not the case, a no go decision will be followed. After this decision, modifications in the administration route or the doses will be checked and applied if an improvement is available and check again this point.
- c) Side effects: in case animals administered with the therapeutic drug suffer an increase of discomfort and/or pain compared to the controls (reaching humane endpoints, section J), a no go decision will be followed. After this decision, modifications in the administration route or the doses will be checked and applied if an improvement is available and check again this point.

For the postmortem study, CSF and blood will be collected for analysis of different molecule levels (e.g. total immunoglobulin levels and specific isotypes and antigen specific immunoglobulin or other factors affected) and cell populations will be studied as well to see how different immune system related cells and molecules can vary due to the disease and the therapy administered. On the other hand, tissues will be collected to be analyzed. Immune related organs – thymus, spleen, lymph nodes, bone marrow –, brain, muscles and other organs which can be affected specifically by the disease developed or the therapy applied – intestines, gut, sciatic nerve, liver, kidney, etc.-. For tissue collection, based on the research question to be answered, different treatments can be applied to the tissue, being necessary to include in some experiments perfusion with different reagents (glutaraldehyde, paraformaldehyde, etc.) of the animals to obtain fixed tissue (e.g. for MG, 2% glutaraldehyde perfused muscles are necessary to study the neuromuscular junction structure). If no perfusions are required, cervical dislocation or CO will be the standard methods to sacrifice the animals.

The techniques we are going to use during this study are: cell based assay (CBA), immunohistochemistry (IHC), immunofluorescent (IF), radioimmunoassay (RIA), ELISA, Western blot/Dot blot, Flow cytometry, polymerase chain reaction (PCR), electron microscopy can be used and are already operational in our group, based on the literature.

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

For the proposed experiment we will make use of a 2-way ANOVA for analysis of behavioral outcomes. Factors for this ANOVA will be phenotype (disease, control), and treatment (saline, prevention, treatment). By making use of a 2-way ANOVA, we can ensure that the minimum number of animals used, will result in maximum power to determine the contribution of the factors involved.

For analysis of plasma and CSF levels of cells/molecules of interest we will make use of a mixed model analysis. The reason for this is that we can account for any missing values due to failure in assays or missing samples from animals. Fixed factors will be the same as those for the behavioral, neurological and locomotor outcomes, as a covariance structure we will choose compound symmetry.

A power analysis will be performed using the software G*Power, which allows to do power analysis for multi-way ANOVA (and also non-parametric criteria/tests: Friedman test for 3 more matched groups).

As mentioned above, go/no-go decisions will be taken according to the pathology. If no differences are found using a test already reported as a significant difference, the experiment will stop. In case there is no previous report about the test, the experiment will continue as a characterization.

B. The animals

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

For this experiment, rodents, including mice and rats, will be used. Different species, strain, and genetic background (also WT) animals can be included. The specie (3), strain based on the genetic background, gender (2) and age range will be adjusted according to the literature to the most suitable. According to the induced nervous system autoimmune pathology, the onset severity and progression of the disease can vary and also the extension of the model as described in Appendix 1 and Appendix 2.

[Redacted text block]

[Redacted text block]

- [Redacted list item]
- [Redacted list item]
- [Redacted list item]
- [Redacted list item]
- [Redacted list item]
- [Redacted list item]
- [Redacted list item]

[Redacted text block]

Control groups are animals sham immunized or injected with an isotype control antibody and on one hand they are useful to detect the effect of the drug when there is no pathology and to subtract it effects, if present, from the effect on the disease groups taking into account the different setups of administration. On the other hand, there is another control group where the disease animals (and the controls), are injected with saline instead of the drug, which will give us the information of the correct development of the pathology (variances between experiments and animals have been observed) and that nothing is related with the injection procedure.

Using this experimental setup, both the effect of phenotype and the effect of the drug can be analyzed. Furthermore, it might be necessary to test different concentrations of the drug.

Based on theory, we estimate that we will need a maximum of 560 animals per drug study based on previous experience with similar models, for example to show a significance reduction of autoantibody titers and disease scores in an EAMG model treated with proteasome inhibition. The maximum experiment size will be 140 ((20 animal/study group*4 groups) + (12 animal/ control group*4 groups)=128 animals + 12 animal for the pain test blank = 140), with 3 replication experiments + 1 dose finding study (140*4=560 animals). In this calculation we are taking into account that some animals will have the same conditions but will be sacrificed in different way according to the tissue analysis requirement for every drug and/or the possible necessity to divide the groups in 2 subgroups because of the tasks overlapping. Since we are planning to test 5 possible drugs, this will bring the maximum amount of animals to 2800. However, we expect that the final group size will be significantly smaller after a power calculation. If possible, we will make use of historical controls or control groups generated in previous studies to lower animal numbers and interim analysis to reduce group size.

Summarizing, a total of 2800 animals (1680 rats and 1120 mice) will be included in the "Therapy efficacy and side effect in nervous system autoimmune models" appendix.

All animals will be obtained from a registered supplier or a researcher who have specific animal models in case the registered supplier doesn't have it.

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.

In terms of replacement, these drugs have been validated extensively by *in vitro* experiments to prove their mechanism of action. However, current *in vitro* systems are not able to model all the aspects of these nervous system autoimmune pathologies which are a complex multifactorial disease involving the contribution of many systemic components. While some of these drugs are already used in humans for the treatment of e.g. multiple myeloma, these drugs first have to show beneficial effects in animal models before they can be used in humans. While we expect that the drugs will be beneficial, there might be unforeseen effects which may result in a worsening of the diseases. Therefore, these drugs first have to be evaluated in an animal model.

With the following experiment we want to validate the use of these drugs in different experimental nervous system autoimmune diseases and if we observe a significant beneficial effect the approval for clinical trials will be faster.

In terms of reduction we can limit the amount of animals by investigating several parameters at once like the contribution of the different phenotypes (disrupted BBB, different autoimmune diseases, etc.). Furthermore, because we are planning on testing at least 4 different drugs, we will analyze if it is possible that historical controls can be used, if cohort effects are absent. This will further limit the number of animals. Next, we also choose an animal model with strong behavioral effects. Furthermore, we will perform intermediate analysis to further reduce the number of animals if possible. By doing power calculations for sample size and implementing go/no-go criteria we further limit the amount of animals used.

In terms of refinement, we have chosen to use the most suitable animal model for each pathology (Appendix 2 and 3). This will limit the amount of time that animals are in experiment, and thus experience possible discomfort. Finally, we are going to adapt the accommodation and the care to the

need of the animals.

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

We are going to adapt the accommodation and the care to the need of the animals. To limit animal discomfort; anaesthesia and analgesia will be used to reduce the discomfort of the animals during the invasive procedures (see Appendix 2 and Appendix 3). The interaction with the therapeutic agent tested has to be checked before. If the discomfort can be reduced, the subject will withdraw the experiment.

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

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.

The animals will be checked daily for any sign of pain or discomfort due to treatment or any other experimental procedures hereby described, and if any of these symptoms are detected, analgesics will be applied to relieve the suffering.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

We can expect adverse effect of the immunization and of the induced disease *per se*, for example, EAMG cause weakness and fatigability and in case of CNS, memory and some neurological and locomotors impaired abilities can be expected (we can't be sure since no literature is available at the moment), which generate stress as explained more in detail in section K. There are no adverse effects related with the venipuncture or the NCS, neither in the behaviour or pain susceptibility tests.

Animals might experience adverse reaction because of the drugs administered and discomfort may be observed due to the pathology the model develops. These outcomes include increased anxiety, cognitive and neurological impairment locomotor deficits and stereotypical behavior. Furthermore, in some neuropsychiatric animal models, epileptic attacks may be observed. Other aspect compromising the welfare of the animals is the *i.p.* injection, which increases the risk of peritonitis and serous fluid production.

Explain why these effects may emerge.

Although some drugs are already used for other indications, some drugs have never been tested before. Therefore these drugs might cause unwanted side effects that may cause discomfort. Depending on dosage they are potent immunosuppressor. The dose that will be administered will be adjusted to the optimal conditions based on the literature or on dose finding pilot studies. However, unexpected interactions due to the autoimmune pathology cannot be ruled out.

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

Regular monitoring (daily) will prevent and minimize the severity of the welfare since the animals are going to receive pain killer, anesthetics and/or analgesics in case they are necessary (and allowed with the therapeutic agent). The administration site will be checked frequently (the immunization side as well as described in Appendix 2 and Appendix 3) to be sure that no complications appear. If any adverse reactions occur, drug dose will be lowered, or the experiment will be halted. Human endpoints are going to be considered if the animal showed a severe discomfort and euthanasia is going to be applied if the individual reach that status.

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.

Humane endpoints will be applied in case of rapid weight loss (>20% within 3 days without any improvement), severe acute inflammation at the immunization point (untreatable by the definition of the veterinarian). The following endpoints are unlikely for completeness we include them since some phenotypes have never been tested before. These includes prolonged diarrhea (>3 days), coughing, self-induced trauma, icterus and severe ulceration or bleeding (Recognition of pain and distress, Principles of Laboratory Animal Science, 2001).

We expect neurological symptoms related with autoimmune models where the CNS is target. The incapability to perform the behaviour tasks, the inability to eat and drink (recognized by dehydration signs, weight loss and general body condition) or the presence of continuous tremors, status elipticus or circling (symptoms from what the animal will not recover) are non expected symptoms that, in case of occur, will be taken as a humane endpoint and the animal will be sacrificed.

So human endpoints will be based on adverse reaction due to treatment. In case of unexpected severe adverse reaction the experiment will be halted.

Indicate the likely incidence.

The incidence will be dependent on the induced disease (Appendix 2 and 3), the character of it: severe or chronic, and on the therapeutic agent and its effects/side effects based also on the dose and the frequency and administration via. Because many combinations can be assessed, is quite hard to determine the incidence value. We estimate the incidence to be extremely low, in the order of 0-5% after a dose finding study. However, for the dose finding study, the incidence cannot be estimated due to the facts that the drug could be a new drug never tested before in vivo and many doses and injections via will be tried or never tested for an specific animal model, where the parameters will be fixed as well.

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').

All the animals will experience some degree of discomfort. The intermediate analysis of the behavioral, neurologic and/or locomotion tests cause mild to moderate discomfort. Operational procedures generate mild discomfort in 100% cases, however, immunization evokes moderate discomfort. Since all the animals will undergo immunization (except the control group for pain tests), the added discomfort of all tasks is moderate.

References:

Agnieszka Krzyzanowska and Carlos Avendaño. Behavioral testing in rodent models of orofacial neuropathic and inflammatory pain. *Brain Behav.* 2012; 2(5): 678–697. doi: 10.1002/brb3.85

Atsushi Sato, Masashi Mizuguchi, Kazutaka Ikeda. Social interaction test: a sensitive method for examining autism-related behavioral deficits. *Protocol exchange | Community contributed.* 2013: doi:10.1038/protex.2013.046

Bailey KR, Crawley JN. Anxiety-Related Behaviors in Mice. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5221/>

Can A, Dao DT, Arad M, Terrillion CE, Piantadosi SC, Gould TD. The Mouse Forced Swim Test. *Journal of Visualized Experiments : JoVE.* 2012;(59):3638. doi:10.3791/3638.

Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM. Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav.* 1989; 32(3):777-85.

Curzon P, Rustay NR, Browman KE. Cued and Contextual Fear Conditioning for Rodents. In: Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience.* 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009. Chapter 2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5223/>

Deacon RMJ. Measuring Motor Coordination in Mice. *Journal of Visualized Experiments : JoVE.* 2013;(75):2609. doi:10.3791/2609.

Denic A., Johnson AJ, Bieber AJ., Warrington AE., Rodriguez M., and Pirko I.. The Relevance of Animal Models in Multiple Sclerosis Research. *Pathophysiology.* 2011; 18(1): 10.

[REDACTED]

Jones MV., Collongues N., de Seze J., Kinoshita M., Nakatsuji Y., Levy M. Review of Animal Models of Neuromyelitis Optica. *Mult Scler Relat Disord.* 2012; 1(4): 174–179.

Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR. Assessment of Social Interaction Behaviors. *Journal of Visualized Experiments : JoVE.* 2011;(48):2473. doi:10.3791/2473.

Kamens HM, Crabbe JC. The parallel rod floor test: a measure of ataxia in mice. *Nature protocols* 2007;2(2):277-81. doi:10.1038/nprot.2007.19

Katzav A, Ben-Ziv T, Blank M, Pick CG, Shoenfeld Y, Chapman J. Antibody-specific behavioral effects: Intracerebroventricular injection of antiphospholipid antibodies induces hyperactive behavior while anti-ribosomal-P antibodies induces depression and smell deficits in mice. *Journal of Neuroimmunology,* 2014: 272(1-2), 10–15.

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Koolhaas JM, Coppens CM, de Boer SF, Buwalda B, Meerlo P, Timmermans PJA. The Resident-intruder Paradigm: A Standardized Test for Aggression, Violence and Social Stress. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 2013;(77):4367. doi:10.3791/4367.

Kulkarni SK1, Singh K, Bishnoi M. Elevated zero maze: a paradigm to evaluate antianxiety effects of drugs. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2007;29(5):343-8.

Lainiola M, Procaccini C, Linden AM. mGluR3 knockout mice show a working memory defect and an enhanced response to MK-801 in the T- and Y-maze cognitive tests. *Behav Brain Res*. 2014; 1 (266) 94-103. doi: 10.1016/j.bbr.2014.03.008.

Leger M, Quideville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P. Object recognition test in mice. *Nature Protocols*. 2013; (8) 2531-2537. doi:10.1038/nprot.2013.155

[REDACTED]

[REDACTED] model of sciatic nerve conduction in healthy and septic mice: reliability and normative data. *Muscle Nerve*. 2009; 40(4): 610-616. doi: 10.1002/mus.21284

[REDACTED]

Mix E, Meyer-Rienecker H, Hartung HP, Zettl UK. Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. *Prog Neurobiol*. 2010; 92(3):386-404.

Osuchowski Mf, Teener J, Remick D. Noninvasive model of sciatic nerve conduction in healthy and septic mice: reliability and normative data. *Muscle & nerve*. 2009; 40(4):610-616. doi:10.1002/mus.21284.

Planaguma, J.; Leypoldt, F.; Mannara, F.; Gutierrez-Cuesta, J.; Martin-Garcia, E.; Aguilar, E.; Titulaer, M.J.; Petit-Pedrol, M.; Jain, A.; Balice-Gordon, R.; et al. Human N-methyl-d-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain J. Neurol*. 2015, 138, 94-109.

Powell SB1, Zhou X, Geyer MA. Prepulse inhibition and genetic mouse models of schizophrenia. *Behav Brain Res*. 2009 Dec 7;204(2):282-94. doi: 10.1016/j.bbr.2009.04.021.

Robert M.J. Deacon , Measuring Motor Coordination in Mice. *J Vis Exp*. 2013; (75): 2609. doi: 10.3791/2609

Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, Henn FA, Gass P. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration. *Neuropsychopharmacology*. 2004; 29 (11): 2007-17.

Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nature protocols*. 2006;1(2):848-858. doi:10.1038/nprot.2006.116.

Xie C, Sun J, Qiao W, Lu D, Wei L, Na M, Song Y, Hou X, Lin Z. Administration of simvastatin after kainic acid-induced status epilepticus restrains chronic temporal lobe epilepsy. *PLoS One*. 2011;6(9):e24966. doi: 10.1371/journal.pone.0024966.

Yang M, Crawley JN. Simple Behavioral Assessment of Mouse Olfaction. *Current protocols in neuroscience / editorial board, Jacqueline N Crawley . [et al]. 2009;CHAPTER:Unit-8.24. doi:10.1002/0471142301.ns0824s48.*

Zutphen L. F. M. Van, Baumans V., Beynen A. C.. Recognition of pain and distress .*Principles of Laboratory Animal Science, Revised Edition, 1st Edition, 2001.*

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.

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Field Code Changed

Animals will be sacrificed at the end of the experiment if no adverse events happen. If the animal present severe discomfort or is suffering extremely, according to the human endpoint, this individual will be sacrificed.

The sacrifice of the animals will be done according to the analysis requirements, in this case, based on the tissue characteristics. If fixed tissues have to be studied, perfusion is necessary to preserve the organ/tissue in an optimal way. Otherwise, normal sacrifice methods (cervical dislocation, CO inhalation) will be used.

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 Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD107002017808

Bijlagen

1

Datum 17 maart 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 2 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Autoimmunity of the nervous system" met aanvraagnummer AVD107002017808. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 15 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de vragen van de CCD beantwoord, de eerste bijlage in drie aparte dierproeven inhoudelijk gesplitst en uw aanvraag daarop aangepast.

Beslissing

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

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.

De voorwaarde met betrekking tot het inzetten van muizen van beide geslachten in dierproef 'Generation of antigenic and antibody sources (2. Antibody generation)' en dierproeven 3.4.4.3-3.4.4.6 (Generation of antigenic and antibody sources (3. Acetylcholine receptor extraction); Active immunization in rodents; Passive immunization in rodents; Therapy efficacy and side effect in nervous system autoimmune models) is gesteld om het aantal dieren in voorraad gedood te verlagen.

U kunt met uw project "Autoimmunity of the nervous system" starten. De vergunning wordt afgegeven van 17 maart 2017 tot en met 1 februari 2022. De looptijd van de vergunning wijkt af omdat de startdatum in de aanvraag in het verleden ligt.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 2 januari 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD voorwaarden. De voorwaarden staan in de vergunning beschreven. Voor het overige nemen wij het advies van de DEC 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.

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:

17 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD107002017808

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
17 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD107002017808



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Maastricht
Adres: Postbus 616
Postcode en plaats: 6200 MD MAASTRICHT
Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 17 maart 2017 tot en met 1 februari 2022, voor het project "Autoimmunity of the nervous system" met aanvraagnummer AVD107002017808, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies. Er worden aanvullende voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Associate Professor.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 2 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. 2 januari 2017, ontvangen op 2 januari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 15 februari 2017

Aanvraagnummer:
AVD107002017808

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Generation of antigenic and antibody sources (1. Brain tissue isolation)				Deze proef is onderdeel van appendix 1.
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / volwassen en embryo's	780	100% Licht	Er worden 180 volwassen ratten en 600 embryo's/ pasgeboren pups gebruikt.
3.4.4.4 Active immunization in rodents				Appendix 2.
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	204	100% Matig	
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	816	100% Matig	
3.4.4.5 Passive immunization in rodents				Appendix 3.
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	360	100% Matig	
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	600	100% Matig	
3.4.4.6 Therapy efficacy and side effect in nervous system autoimmune models				Appendix 4.
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	1.120	100% Matig	
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	1.680	100% Matig	

Aanvraagnummer:
AVD107002017808

3.4.4.2 Generation of antigenic and antibody sources (2. Antibody generation)				Deze proef is onderdeel van appendix 1.
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	60	100% Matig	
	Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) /	90	100% Matig	
3.4.4.3 Generation of antigenic and antibody sources (3. Acetylcholine receptor extraction)				Deze proef is onderdeel van appendix 1.
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	18	100% Matig	

Voorwaarden

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

- 1) De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IVD.
- 2) 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.
- 3) Voor de muizen die voor het monoclonaal antilichaam experiment (Generation of antigenic and antibody sources (2. Antibody generation)) worden gebruikt (60 muizen) worden beide geslachten in evenredige aantallen gebruikt.
- 4) De IVD ziet erop toe dat voor dierproeven 3.4.4.3-3.4.4.6 (Generation of antigenic and antibody

Aanvraagnummer:
AVD107002017808

sources (3. Acetylcholine receptor extraction); Active immunization in rodents; Passive immunization in rodents; Therapy efficacy and side effect in nervous system autoimmune models) een goed onderbouwde keuze voor het geslacht gemaakt wordt, gebaseerd op de beschikbare literatuur en gestandaardiseerde richtlijnen voor elk model. Indien mogelijk dienen beide geslachten te worden ingezet.



Aanvraagnummer:

AVD107002017808

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:

AVD107002017808

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Inventaris Wob-verzoek W17-08										
nr.	document NTS 2017817	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS initieel			x						
3	Projectvoorstel				x	x		x		
4	Bijlage 1				x	x		x		
5	Bijlage 2				x	x		x		
6	Bijlage 4				x	x		x		
7	Bijlage 3				x	x		x		
8	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
9	NTS definitief	x								
10	Ontvangstbevestiging en factuur				x		x	x		
11	Verzoek om advies DEC				x		x	x		
12	DEC advies				x	x	x	x		
13	Advies CCD		x							x
14	Beschikking en vergunning				x		x	x		

17 FEB. 2017



Centrale Commissie Dierproeven

1

AVD401002017 817

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	40100
		<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 Wageningen Research
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	908104
		Straat en huisnummer	Akkermaalsbos 12
		Postbus	59
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>	Postcode en plaats	6700AB Wageningen
		IBAN	NL10RABO0397066465
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR
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	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	
1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input type="checkbox"/> Ja > <i>Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag</i>	
	<input checked="" 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	1 - 3 - 2017
	Einddatum	31 - 12 - 2021
3.2 Wat is de titel van het project?	Vermeerdering van Europese aal ter bevordering van duurzame aquacultuur	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Vermeerdering van Europese aal ter bevordering van duurzame aquacultuur	
3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?	Naam DEC	DEC WUR
	Postadres	Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen
	E-mailadres	DEC@wur.nl

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1827 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 + 5 bijlagen
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing**
- Melding Machtiging
- Bestelorder-WUR10361.86

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[REDACTED]
Functie	[REDACTED]
Plaats	Wageningen
Datum	15 - 2 - 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.zbo-ccd.nl.
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

1 Algemene gegevens

1.1	Titel van het project	Vermeerdering van Europese aal ter bevordering van duurzame aquacultuur
1.2	Looptijd van het project	1-3-2017 - 31-12-2021
1.3	Trefwoorden (maximaal 5)	Europese aal of paling <i>Anguilla anguilla</i> ; duurzame aquacultuur; voortplanting; reproductie; fysiologie

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 Projectbeschrijving

3.1	Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang)	Het doel van dit project is om een succesvolle kunstmatige voortplanting van Europese aal (of paling) te bewerkstelligen dat zal kunnen leiden tot opschaling naar bedrijfsmatige productie van glasaal in Nederlandse aquacultuurbedrijven.
3.2	Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	<p>Succesvolle voortplanting in gevangenschap zou de aquacultuur kunnen voorzien van glasaal en de productiecyclus sluiten. Op deze manier zouden zowel de aquacultuur als het managen van de natuurlijke populaties duurzaam kunnen worden.</p> <p>Maatschappelijk gezien wordt zo een hooggewaardeerd consumptieproduct gewaarborgd dat afkomstig is uit een duurzaam productieproces. De druk op de natuurlijke populatie wordt daarmee verminderd zodat de natuurlijke populatie meer kans krijgt te herstellen. Een gezonde natuurlijke populatie doet een tot-de-verbeelding-sprekend dier voortbestaan.</p> <p>Succesvolle vermeerdering zou direct voordeel leveren aan de betrokken bedrijven doordat zij kunnen aantonen bij te dragen aan het creëren van een duurzame aal aquacultuur en dus aan maatschappelijk relevant opereren. Dit betekent een enorme toename in economische waarde.</p> <p>Wetenschappelijk zou het de wereldwijde primeur betekenen tot het gecontroleerd reproduceren van Europese aal en daarmee ver voorop lopen in de kennisinfrastructuur.</p>

3.3	Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	<p>Experimentele vissoorten betreffen de Europese aal <i>Anguilla anguilla</i> en de zg short-finned eel <i>Anguilla australis</i>.</p> <p>Het totale aantal unieke vissen dat wordt gebruikt is: Glasaal van kwekerij: 800 Juveniele rode aal van kwekerij: 730 Wilde aal vrouw: 730 Wilde aal man: 1370 <i>A. australis</i> wilde aal vrouw: 40</p> <p>Verwachte productie: Zelf geweekte larven die uitgroeien tot glasaal: 25000-37500 Zelf geweekte larven die worden gebruikt: 5000</p>
3.4	Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Dieren kunnen licht ongerief ervaren door bloed- en weefselafname; injectie met hormonen of van een PIT tag; het afstrijken van gameten, en van een kleine groep door het zwemmen bij hoge snelheden.
3.5	Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	Dieren kunnen licht ongerief ervaren. Het ongerief van dieren (1720 dieren) die regelmatig injecties ontvangen wordt als matig ingeschat.
3.6	Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	Dieren worden ge-euthaniseerd. Dit geldt niet voor de geproduceerde glasalen die gebruikt zullen gaan worden voor vermeerdering.

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.	Simulatie niet mogelijk, alleen proeven met levende dieren mogelijk.
4.2	Vermindering Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt.	In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen.
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.	Experimentele vissoorten betreffen de Europese aal <i>Anguilla anguilla</i> en de zg short-finned eel <i>Anguilla australis</i> omdat de vraagstelling <i>Anguilla anguilla</i> betreft en een vergelijking includeert met <i>A. australis</i> als aalsoort die minder ver naar de paaigronden hoeft te zwemmen en daardoor gevoeliger is voor natuurlijke stimulatie van de maturatie. Er wordt alles aan gedaan om ongerief tot een minimum te reduceren om het zo min mogelijk belastend te maken voor de dieren. Bovendien is dit van belang omdat ongerief als eerste de maturatie en reproductie beïnvloedt en daarmee een positief resultaat.
4.4	Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.	De professionele dierverzorgers zorgen voor optimale systeem omstandigheden en waterkwaliteit condities om viswelzijn en gezondheid te waarborgen. Bovendien monitoren ze de vissen dagelijks op afwijkend gedrag die ziekte indiceren. Tijdens een deel van de handelingen zullen vissen zijn verdoofd om ongerief te minimaliseren als dat al nodig is.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

**Form
Project proposal**

- This form should be used to write the project proposal of 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.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research
1.3	Provide the title of the project.	Vermeerdering van Europese aal ter bevordering van duurzame aquacultuur

2 Categories

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

De aal of paling heeft een complexe levenscyclus. Als leptocephalus larven worden ze door de oceanische stroming naar de brakke estuaria en zoetwater riviersystemen gestuurd waarna ze die als transparante glasaaltjes intrekken. Na een lange groeifase als rode aal worden de aal schier. Een schieraal is een puberende aal die gonadenontwikkeling vertoont en vele morfologische en fysiologische veranderingen die de aal functioneel voorbereiden op en begeleiden in de reproductieve oceanische migratie naar de Sargassozee. De meest opmerkelijke verandering is het groter worden van de ogen. Als schieraal migreren ze terug naar de paaigronden waar ze reproducen en sterven. Het migratiepatroon is karakteristiek voor de 16 aalsoorten van het *Anguilla* genus zoals voor de Europese aal *A. anguilla* die 6000 km naar de Sargasso Zee migreert en de Japanse aal *A. japonica* die 4000 km naar de Mariana trog migreert. Paling is wereldwijd een zeer gewaardeerde consumptievis en de marktvraag is hoog voor bijvoorbeeld gerookte aal in Noord-West Europa en voor Kabayaki in Japan. Visserij en aquacultuur proberen in deze behoefte te voorzien. Als migrerende vissoort met een hoog vetpercentage heeft aal hoge niveaus aan de gezonde omega-3 vetzuren. Het probleem is echter dat de aal populaties wereldwijd sterk afnemen sinds de 1970er jaren. Ondanks management maatregelen en andere beschermende inspanningen staat de Europese aal op de IUCN rode lijst als 'critically endangered'. De bestaande kwekerijen zijn nog altijd afhankelijk van wilde glasaal die vervolgens tot marktgroottes worden opgekweekt. Slechts een beperkte hoeveelheid is beschikbaar voor de aquacultuur en maatschappelijke zorg bestaat over het gebrek aan duurzaamheid.

Succesvolle voortplanting in gevangenschap zou de aquacultuur kunnen voorzien van glasaal en de productiecycclus sluiten. Op deze manier zouden zowel de aquacultuur als het managen van de natuurlijke populaties duurzaam kunnen worden. Het doel van dit project is om een succesvolle voortplanting van Europese aal te bewerkstelligen dat zal kunnen leiden tot opschaling naar bedrijfsmatige productie van glasaal in aquacultuurbedrijven.

De Europese aal migreert éénmalig 6.000 km naar de Sargassozee om te paaien en vervolgens te sterven. Dit leiden we af uit twee feiten: in het najaar trekken schieralen richting zee, en in het voorjaar zijn twee dagen oude larven aangetroffen in de Sargassozee. Alle bestaande kennis van seksuele maturatie en reproductie komt uit het lab. Onderzoeksinspanningen hebben geregeld geleid tot larvenproductie maar larvale sterften zijn groot en men is er nog niet in geslaagd om larven van de Europese aal in leven te houden met voer. Als de voeding uit de eidooier op is sterven de larven.

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?

Het doel van dit project is om een succesvolle kunstmatige reproductie van Europese aal (of paling) te bewerkstelligen dat zal kunnen leiden tot opschaling naar bedrijfsmatige productie van glasaal in Nederlandse aquacultuurbedrijven.

De innovatieopgave bestaat uit het verkrijgen van zo sterk mogelijke ouderdieren en zo sterk mogelijke larven die, nadat de voeding uit de dooierzak op is, in leven kunnen worden gehouden met specifiek ontwikkeld visvoer. Specifiek: 1) het optimaliseren van maturatie (geslachtsrijping) protocollen en eikwaliteit; 2) controleerbare en voorspelbare larvenproductie, en 3) het opkweken van de larven tot glasaal. Dit onderzoek is primair succesvol als het doel, een succesvolle vermeerdering van Europese aal, wordt bewerkstelligd. Er zijn dan conditionerings- en maturatieprotocollen geoptimaliseerd hetgeen heeft geleid tot optimale ei- en spermakwaliteit; voorspelbare en controleerbare larvenproductie, en opkweekmogelijkheden van de larven. Daarmee vormt dit onderzoek dan de essentiële opmaat naar een tweede fase, de opschaling naar bedrijfsmatige productie van glasaal in aquacultuurbedrijven.

Verwacht wordt dat deze eerste fase over een periode van vijf jaar kan worden afgerond waarna een tweede fase kan beginnen die zal resulteren in bedrijfsmatige productiemogelijkheden. Het onderzoekstraject dat is uitgestippeld gaat uit van twee fasen: een eerste fase waarin wordt verwacht

glasaal te produceren, en een tweede fase dat gericht is op opschaling. Tussen beide fasen ligt een beslismoment waarbij op basis van de gehaalde resultaten wordt bepaald of, en zo ja hoe, het onderzoek zal worden vervolgd. De termijn van fase 1 is gebaseerd op een acceleratie van het onderzoek door de gepubliceerde kennis van en samenwerking met Japanse onderzoekers die voor de Japanse aal de cyclus hebben gesloten.

3.3 Relevance

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

Succesvolle vermeerdering levert direct voordeel aan de betrokken bedrijven doordat zij kunnen aantonen bij te dragen aan het creëren van een duurzame aal aquacultuur en dus aan maatschappelijk relevant opereren. Dit zorgt voor een enorme toename in economische waarde. Het levert de kennisinstelling de wereldwijde primeur tot het gecontroleerd reproduceren van Europese aal en daarmee ver voorop lopend in de kennisinfrastructuur.

Succesvolle vermeerdering kan de aquacultuur voorzien van pootgoed (grondstof) en loskoppelen van de visserij om zodoende zowel een duurzaam natuurlijk bestand als duurzame aquacultuur te creëren. Uiteindelijk zijn de betrokken bedrijven hiermee niet meer afhankelijk van de natuurlijke populatie van glasaal die vanwege een dramatische afname hoge prijzen kent. Bovendien neemt dit een belangrijke maatschappelijke zorg weg en creëert daarmee een "licence to produce" voor de palingaquacultuur bedrijven en de handel.

3.4 Research Strategy

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

Het doel achter het kunnen vermeerderen van de Europese aal is om bestaande industrie te rechtvaardigen en te streven naar een verduurzaming waarbij de druk op de natuurlijke populatie geheel kan worden gereduceerd. De bestaande bottlenecks in het gehele reproductieprotocol zoals het op natuurlijke wijze kunnen stimuleren van de maturatie en de ontwikkeling van een voer dat larven willen en kunnen eten en waarop ze kunnen groeien, vraagt om een integratieve aanpak met inzet van state-of-the-art expertise en tools.

De innovatieopgave bestaat uit: 1) het optimaliseren van maturatieprotocollen en ei- en spermakwaliteit; 2) regelmatige en voorspelbare larvenproductie; 3) het opkweken van de larven tot glasaal.

Een eerste fase project heeft inmiddels geleid tot ontwikkeling van tools om ouderdieren te conditioneren en zelfs tot productie van vier verschillende batches larven. [REDACTED]. Het Eel Reproduction Innovation Centre EELRIC is gelanceerd zodat vanaf 2017 de belangrijkste bottlenecks ook vanuit een internationale samenwerking kunnen worden opgelost.

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.

De dierproeven zijn gekoppeld aan elk van de beschreven taken. In eerste instantie worden die uitgevoerd aan ouderdieren en nakomelingen waarbij de ultieme prestatie zal zijn dat uiteindelijk de nakomelingen de ouderdieren zullen zijn.



[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

[Redacted text]

* In principe valt aal onder de Flora en Faunawet, maar er zijn uitzonderingen hierop volgens "Regeling Vrijstelling beschermde dieren- en plantensoorten Flora- en Faunawet":

Van de verboden, bedoeld in de artikelen 9 en 10 van de wet, en het verbod op het onder zich hebben van beschermde inheemse diersoorten, bedoeld in artikel 13, eerste lid, van de wet, wordt vrijstelling verleend voor de aal (*Anguilla anguilla*).

De vrijstelling, bedoeld in het eerste lid, is alleen van toepassing, indien kan worden aangetoond:

- dat is voldaan aan het bij of krachtens de Visserijwet 1963 bepaalde, of
- dat de aal in Nederland is gebracht of verkregen overeenkomstig het bij of krachtens de wet bepaalde en met inachtneming van de basisverordening en uitvoeringsverordening.

Als ze dus gevangen worden door beroepsvissers vallen ze onder de Visserijwet. Aangezien dit het geval is prevaleert de Visserijwet boven de Flora&Fauna Wet





Referenties

- Böhm, T., Graziano, M., Blom, E., Brittijn, S.A., Dirks, R.P., Palstra, A.P. (2016) Simulated migration of feminised eels to stimulate and predict the sexual maturation response. ICBF2016, June 12-18, San Marcos (US).
- Chai Y., Tosaka R., Abe T., Sago K., Sago Y., Hatanaka E., Ijiri S. and Adachi S. 2010. The relationship between the developmental stage of oocytes in various seasons and the quality of the egg obtained by artificial maturation in the feminized Japanese eel *Anguilla japonica*. *Aquaculture Sci.* 58, 269-278.
- Dirks, R.P., Burgerhout, E., Brittijn, S.A., de Wijze, D.L., Ozupek, H., Tuinhof-Koelma, N., Minegishi, Y., Jong-Raadsen, S.A., Spaink, H.P., van den Thillart, G.E.E.J.M. (2014) Identification of molecular markers in pectoral fin to predict artificial maturation of female European eels (*Anguilla anguilla*). *General and Comparative Endocrinology* 204: 267–276.
- Ijiri, S., Tsukamoto, K., Chow, S., Kurogi, H., Adachi, S., Tanaka, H. (2011) Controlled reproduction in the Japanese eel (*Anguilla japonica*), past and present. *Aquaculture Europe Vol. 36* (2): 13-17.
- Mes, D., Dirks, R.P., Palstra, A.P. (2016) Simulated migration under mimicked photothermal conditions enhances sexual maturation of farmed European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquaculture* 452: 367–372.
- Palstra, A.P., Cohen, E., Niemantsverdriet, P., van Ginneken, V., van den Thillart, G.E.E.J.M. (2005) Artificial maturation and reproduction of European silver eel: Development of oocytes during final maturation. *Aquaculture* 249 (1-4): 533-547
- Palstra, A., van Ginneken, V., van den Thillart, G. (2008) Cost of transport and optimal swimming speeds in farmed and wild European silver eels (*Anguilla anguilla*). *Comparative Biochemistry and Physiology A* 151: 37-44.
- Sébert, M.E., Amérand, A., Vettier, A., Weltzien, F-A, Pasqualini, C., Sébert, P., Dufour, S. (2007) Effects of high hydrostatic pressure on the pituitary–gonad axis in the European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *General and Comparative Endocrinology* 153 (1–3): 289–298.
- Tanaka H (2003) Techniques for larval rearing. In: Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K (Eds), *Eel Biology*, Springer, Heidelberg pp. 427–434.
- Todd, P.R. (1981) Timing and periodicity of migrating New Zealand freshwater eels (*Anguilla* spp.). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* IS : 225-235.al., 2003).

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



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	
2	
3	
4	

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.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure 

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.



Referenties



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

[Redacted]

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

Bepaling van het aantal dieren per groep is gebaseerd op ervaring van groepsgrootten bij bepaling van fysiologische parameters. Bij dergelijke bepalingen is vaak sprake van exponentiele reacties waarbij niet alle vissen reageren. Daardoor is sprake van een dusdanige individuele variatie dat kleinere groepsgrootten zeer frequent waarden van $P=0.06$ of $P=0.07$ als uitkomst geven van statistische vergelijkingen. Een minimale groepsgrootte van $N=10$ is daardoor vereist. Een power analyse voor significante gewichtsverschillen tussen groepen vissen onderschrijft dit (Handboek proefdierkunde blz. 226-230 waarbij gestreefd wordt naar een $SD\%$ van zo'n 75% bij een 100% gemeten verschil).

B. The animals

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

De experimentele vissoort betreft de Europese aal *Anguilla anguilla*.
Herkomst betreft een commerciële aal kwekerij, zowel voor glasaal als voor juveniele aal.

[Redacted]

[Redacted]

Totaal aan proefdieren:

[REDACTED]

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.

Vervanging Simulatie niet mogelijk, alleen proeven met levende dieren mogelijk. Vermindering In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen. Verfijning Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Er wordt geen ongerief verwacht [REDACTED]. Het enige potentiële ongerief resulteert van bloedafname van de verdoofde vis die gesampeld zal worden.

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

Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Het is ook in het belang van het experiment zelf om de negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo goed als uit te sluiten aangezien dit als eerste de maturatie en reproductie beïnvloedt. De professionele diervverzorgers zorgen voor optimale systeem omstandigheden en waterkwaliteit condities. Bovendien monitoren ze de vissen dagelijks op afwijkend gedrag die ziekte indiceren. Tijdens de handelingen zullen vissen zijn verdoofd om ongerief te minimaliseren. [REDACTED]

[REDACTED]

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.

Procedures zijn vaker uitgevoerd maar worden hier juist toegepast om de methode te valideren en uitgangsmateriaal te creëren voor vervolgonderzoek.

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?

Vissen kunnen gering ongerief ondervinden.

Explain why these effects may emerge.

Stress tgv hanteren.

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

Goede dierverzorging tracht effecten te minimaliseren. Verdoving wordt toegepast. Verdoving is nodig om het dier geen schade toe te brengen tijdens het uitvoeren van handelingen.

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.

Indicate the likely incidence.

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).

Licht.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Voor dieren die gesampeld worden is dissectie en daarom euthanasie vereist.

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.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure 

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.



Referenties



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

Referenties

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

Bepaling van het aantal dieren per groep is gebaseerd op ervaring van groepsgrootten bij bepaling van fysiologische parameters. Bij dergelijke bepalingen is vaak sprake van exponentiele reacties waarbij niet alle vissen reageren. Daardoor is sprake van een dusdanige individuele variatie dat kleinere groepsgrootten zeer frequent waarden van $P=0.06$ of $P=0.07$ als uitkomst geven van statistische vergelijkingen. Een minimale groepsgrootte van $N=10$ is daardoor vereist. Een power analyse voor significante gewichtsverschillen tussen groepen vissen onderschrijft dit (Handboek proefdierkunde blz. 226-230 waarbij gestreefd wordt naar een SD% van zo'n 75% bij een 100% gemeten verschil).

B. The animals

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

De experimentele vissoort betreft de Europese aal *Anguilla anguilla*, zowel mannen als vrouwen.

Oorspronkelijke herkomst betreft een commerciële aal kwekerij [redacted] Wilde alen zijn afkomstig uit [redacted] schone locaties die nog schiere alen opleveren met geringe contaminant belasting. Daarnaast zijn er voor de vergelijkingen nog kleine hoeveelheden voorzien aan wilde Zuid Europese alen en *Anguilla australis* (geïmporteerd uit Nieuw-Zeeland).

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

Totaal aan proefdieren:

[Redacted text block]

Referenties

[Redacted text block]

[REDACTED]

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.

Vervanging Simulatie niet mogelijk, alleen proeven met levende dieren mogelijk. Vermindering In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen. Verfijning Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Er wordt geen ongerief verwacht van [REDACTED]. Het enige potentiële ongerief resulteert van bloedafname van de verdoofde vis die gesampeld zal worden.

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

Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Het is ook in het belang van het experiment zelf om de negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo goed als uit te sluiten aangezien dit als eerste de maturatie en reproductie beïnvloedt. De professionele

dierverzorgers zorgen voor optimale systeem omstandigheden en waterkwaliteit condities. Bovendien monitoren ze de vissen dagelijks op afwijkend gedrag die ziekte indiceren. Tijdens de handelingen zullen vissen zijn verdoofd om ongerief te minimaliseren.

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.

Procedures zijn vaker uitgevoerd maar [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.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Vissen kunnen gering ongerief ondervinden.

Explain why these effects may emerge.

Stress tgv hanteren.

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

Goede dierverzorging tracht effecten te minimaliseren. Verdoving wordt toegepast. Verdoving is nodig om het dier geen schade toe te brengen tijdens het uitvoeren van handelingen.

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.

Indicate the likely incidence.

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).

Licht.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Voor dieren die gesampeld worden is dissectie en daarom euthanasie vereist.

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.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure 

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.



Referenties

[Redacted text block]

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

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[REDACTED]

Referenties

[REDACTED]

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

Bepaling van het aantal dieren per groep is gebaseerd op ervaring van groepsgrootten bij bepaling van fysiologische parameters. Bij dergelijke bepalingen is vaak sprake van exponentiele reacties waarbij niet alle vissen reageren. Daardoor is sprake van een dusdanige individuele variatie dat kleinere groepsgrootten zeer frequent waarden van $P=0.06$ of $P=0.07$ als uitkomst geven van statistische vergelijkingen. Een minimale groepsgrootte van $N=10$ is daardoor vereist. Een power analyse voor significante gewichtsverschillen tussen groepen vissen onderschrijft dit (Handboek proefdierkunde blz. 226-230 waarbij gestreefd wordt naar een SD% van zo'n 75% bij een 100% gemeten verschil).

B. The animals

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

De experimentele vissoort betreft de Europese aal *Anguilla anguilla*.

Deze bijlage gaat uit van gebruik van dieren [REDACTED] en die oorspronkelijk afkomstig waren van een commerciële aal kwekerij of, [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

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.

Vervanging Simulatie niet mogelijk, alleen proeven met levende dieren mogelijk. Vermindering In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen. Verfijning Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Het potentiële ongerief resulteert van bloed- en weefselafname van de verdoofde vis die gesampeld zal worden; [REDACTED]

[REDACTED]

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

Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Het is ook in het belang van het experiment zelf om de negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo goed als uit te sluiten aangezien dit als eerste de maturatie en reproductie beïnvloedt. In de experimentele opstellingen voor schieralen worden PVC pijpen toegevoegd als schuilmogelijkheid. De professionele diervverzorgers zorgen voor optimale systeem omstandigheden en waterkwaliteit condities. Bovendien monitoren ze de vissen dagelijks op afwijkend gedrag die ziekte indiceren. Tijdens de handelingen zullen vissen zijn verdoofd om ongerief te minimaliseren.

[REDACTED]

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.

Procedures zijn vaker uitgevoerd maar worden hier juist toegepast om de methoden te valideren en te optimaliseren, en te streven naar methoden die het ongerief minimaliseren.

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?

Vissen kunnen gering ongerief ondervinden.

Explain why these effects may emerge.

Stress tgv hanteren; [REDACTED]
[REDACTED]

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

Goede dierversorgung tracht effecten te minimaliseren. Verdoving wordt toegepast. Verdoving is nodig om het dier geen schade toe te brengen tijdens het uitvoeren van handelingen.

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.

If animals have open wounds they will be treated with Betadine but if wounds do not heal animals will be euthanized.

Indicate the likely incidence.

incidental:

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).

Licht. Matig voor dieren die tenminste [REDACTED] injecties krijgen [REDACTED].

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Voor dieren die gesampeld worden is dissectie en daarom euthanasie vereist. Voor de andere dieren geldt dat schieralen niet meer eten en dus uiteindelijk zullen sterven als ze niet onmiddellijk worden ge-euthaniseerd.

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.zbo-ccd.nl.
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 4	Type of animal procedure 

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.



Referenties



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



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

Bepaling van het aantal dieren per groep is gebaseerd op ervaring van groepsgrootten bij bepaling van fysiologische parameters. Bij dergelijke bepalingen is vaak sprake van exponentiele reacties waarbij niet alle vissen reageren. Daardoor is sprake van een dusdanige individuele variatie dat kleinere groepsgrootten zeer frequent waarden van $P=0.06$ of $P=0.07$ als uitkomst geven van statistische vergelijkingen. Een minimale groepsgrootte van $N=10$ is daardoor vereist. Een power analyse voor significante gewichtsverschillen tussen groepen vissen onderschrijft dit (Handboek proefdierkunde blz. 226-230 waarbij gestreefd wordt naar een SD% van zo'n 75% bij een 100% gemeten verschil).

B. The animals

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

De experimentele vissoort betreft de Europese aal *Anguilla anguilla*.



Referenties



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.

Vervanging Simulatie niet mogelijk, alleen proeven met levende dieren mogelijk. Vermindering In alle gevallen worden minimale aantallen gebruikt om wetenschappelijk verantwoorde resultaten te verkrijgen. Verfijning Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Er wordt geen ongerief verwacht.

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

Er wordt alles aan gedaan om stress tot een minimum te reduceren. Het is ook in het belang van het experiment zelf om de negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo goed als uit te sluiten. De professionele dierverzorgers zorgen voor optimale systeem omstandigheden en waterkwaliteit condities. Bovendien monitoren ze de vissen dagelijks op afwijkend gedrag die ziekte indiceren. [REDACTED]

[REDACTED]

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.

Procedures zijn vaker uitgevoerd. Men is echter nog nooit in staat geweest een larve van de Europese aal op een voer te krijgen waarop het kan overleven en groeien.

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?

Geen.

Explain why these effects may emerge.

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

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.

Indicate the likely incidence.

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).

Licht.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

L. Method of killing

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Voor dieren die gesampeld worden is dissectie en daarom euthanasie vereist.

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

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: maandag 20 maart 2017 14:52
Aan: 'Info-zbo'
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: status aanvraag AVD401002017817
Bijlagen: Documenten Aanvraag Vergunning Dierproeven AVD_40100

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Hallo mevrouw [REDACTED],
Vanmorgen om 11:13 uur heb ik de definitieve versie van de NTS via NetFTP opgestuurd.
Dit is volgens mij de definitieve versie is. De zin: [REDACTED]
[REDACTED] is verwijderd.
Met vriendelijke groet,
[REDACTED]

Van: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Verzonden: maandag 20 maart 2017 14:12
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: status aanvraag AVD401002017817

Beste [REDACTED]
Met excuses voor de verlate reactie, maar de NTS van 28 februari waar u aan refereert hoorde bij de documenten van het projectvoorstel zoals aangepast na het advies van de DEC. De specifieke aanpassing is op verzoek van de CCD zoals besproken in de vergadering van 10 maart. Ik wil u alsnog verzoeken om de NTS aan te passen en alleen de dier aantallen op te nemen welke onder de WOD vallen.

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: maandag 13 maart 2017 15:37
Aan: 'Info-zbo'
CC: [REDACTED]
Onderwerp: RE: status aanvraag AVD401002017817

Hallo [REDACTED]
Van mevrouw [REDACTED] kregen wij het verzoek een aangepaste NTT in te leveren voor project 401002017817. Nu zie ik dat op 28/2 een aangepaste versie van de NTS is opgestuurd. Ik ga ervan uit dat de vergunning kan worden verleend.
Met vriendelijke groet,
[REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
Wageningen University & Research
Facilitair Bedrijf
Afdeling Vastgoed & Huisvesting, sectie Veiligheid & Milieu
Postbus 59, 6700 AB Wageningen

[REDACTED]
Akkermaalsbos 12, 6708 WB Wageningen

[REDACTED]
[REDACTED]
www.wur.nl
www disclaimer-nl.wur.nl

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

Verzonden: vrijdag 10 maart 2017 16:36

Aan: [REDACTED]

Onderwerp: status aanvraag AVD401002017817

Geachte [REDACTED]

Uw aanvraag AVD401002017817 getiteld: Vermeerdering van Europese aal ter bevordering van duurzame aquacultuur, is besproken door de CCD. De CCD heeft besloten uw aanvraag te vergunnen, maar wil u vragen de Niet Technische Samenvatting aan te passen voor wat betreft het aantal dieren. De dieren die niet worden gezien als proefdieren moeten uit de NTS verwijderd worden dit is de zin: [REDACTED]

Kunt u een aangepaste versie van de NTS sturen? zodra deze is ontvangen sturen wij u de beschikking toe,

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!)



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

██████████

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD401002017817

Bijlagen

2

Datum 16 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 februari 2017. Het gaat om uw project "Vermeerdering van Europese aal ter bevordering van duurzame aquacultuur". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD401002017817. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

16 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD401002017817

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
16 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002017817

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 40100
Naam instelling of organisatie: Stichting Wageningen Research
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 908104
Straat en huisnummer: Akkermaalsbos 12
Postbus: 59
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN
IBAN: NL10RABO0397066465
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Wageningen UR

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Datum:

16 februari 2017

Aanvraagnummer:

1002017817

Over uw project

Geplande startdatum:

1 maart 2017

Geplande einddatum:

31 december 2021

Titel project:

Vermeerdering van Europese aal ter bevordering van duurzame aquacultuur

Titel niet-technische samenvatting:

Vermeerdering van Europese aal ter bevordering van duurzame aquacultuur

Naam DEC:

DEC WUR

Postadres DEC:

Droevendaalsesteeg 4 6708 PB Wageningen

E-mailadres DEC:

DEC@wur.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1.827,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam:

[Redacted]

Functie:

[Redacted]

Plaats:

Wageningen

Datum:

15 februari 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002017817
Bijlagen
2

Datum 16 februari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 16 februari 2017
Vervaldatum: 18 maart 2017
Factuurnummer: 170817
Ordernummer: WUR1036186

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002017817	€ 1.827,00

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-ccd.nl
Verzonden: donderdag 16 februari 2017 8:05
Aan: DEC@wur.nl
Onderwerp: Verzoek om advies over projectvergunningaanvraag AVD401002017817
Bijlagen: Copy_of_AVD401002017_817_Aanvraag_projectvergunning_.pdf; 2. _AVD401002017817_Description_Animal_Procedure_5x_.pdf; AVD401002017_817_Aanvraag_projectvergunning_.pdf; 1._AVD401002017817_Project_Proposal.pdf; 3. _AVD401002017817_NTS_ontsmet.pdf; AVD401002017_817_Aanvraag_projectvergunning.pdf

Geachte leden van DEC WUR

De Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) verzoekt u in het kader van vergunningverlening (of wijziging van een vergunning) advies te geven over het project met als titel: "Vermeerdering van Europese aal ter bevordering van duurzame aquacultuur" en aanvraagnummer: AVD401002017817.

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

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

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

De CCD verzoekt u uiterlijk binnen 20 werkdagen, na 16-02-2017, uw advies bij de CCD in te dienen. Indien de aanvraag door uw commissie niet in behandeling kan worden genomen, dient u dit per ommegaande per e-mail aan de CCD te melden.

Ingeval uw commissie tussentijds aanvullende informatie wil inwinnen bij de aanvrager kan de termijn worden opgeschort. U dient de CCD zo spoedig mogelijk op de hoogte te stellen van deze opschorting. Zodra de opschortende termijn is beëindigd, stelt u de CCD hiervan onverwijld op de hoogte. Opschorting van de adviestermijn vindt niet plaats ingeval u ten behoeve van uw advies een onafhankelijk extern expert raadpleegt.

Met vriendelijke groeten,

CCD

[REDACTED]
Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Wageningen
University & Research

DATUM
28 februari 2017

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD401002017817

ONS KENMERK
AVD401002017817

POSTADRES

BEZOEKADRES

INTERNET
www.wur.nl

KvK NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON

TELEFOON

E-MAIL
DEC@wur.nl

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR heeft gegeven aangaande het project ""

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD401002017817**
2. Titel van het project: Vermeerdering van Europese aal ter bevordering van duurzame aquacultuur
3. Titel van de NTS: Vermeerdering van Europese aal ter bevordering van duurzame aquacultuur
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
[REDACTED]
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 14-02-2017
Aanvraag compleet: 14-02-2017
In vergadering besproken: 20-02-2017
Termijnonderbreking(en) van / tot: 22-2-2017 t/m 27-02-2017
Aanpassing aanvraag: 27-02-2017
Advies aan CCD: zie datum brief
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
9. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: 22-02-2017
Gestelde vragen en antwoorden:
 - Het uiteindelijke doel is het verder brengen van de palingkweeksector met daarbij als indirect doel het behouden van de natuurlijke populatie. De DEC heeft haar bedenkingen bij de haalbaarheid van het uiteindelijke doel en is van mening dat het doel zeer ambitieus is gesteld. Zij baseert dit op wat er al aan onderzoek gedaan is op dit gebied en wat niet gelukt is.
M.b.t. de projectbeschrijving: De DEC is echter van mening dat de belangen voor de sector en de ecologie dermate groot zijn dat dit het onderzoek rechtvaardigt. De DEC heeft de onderzoeker gevraagd dit explicieter in zijn aanvraag te beschrijven. Kan de onderzoeker

aangeven op basis waarvan men aanneemt dat het over 4 jaar mogelijk zal zijn om paling in gevangenschap te kweken. De DEC wil dat de onderzoeker ook go/no go's inbouwt tussen de diverse stappen in het project.

Het onderzoekstraject dat is uitgestippeld gaat uit van twee fasen: een eerste fase waarin wordt verwacht glasaal te produceren, en een tweede fase dat gericht is op opschaling. Tussen beide fasen ligt een beslismoment waarbij op basis van de gehaalde resultaten wordt bepaald of, en zo ja hoe, het onderzoek zal worden vervolgd. De termijn van fase 1 is gebaseerd op een acceleratie van het onderzoek door de gepubliceerde kennis van en samenwerking met Japanse onderzoekers die voor de Japanse aal de cyclus hebben gesloten.

- De HEP's ontbreken. Omdat er gesproken wordt over uitvallers is de DEC van mening dat er HEP's gedefinieerd moeten worden. Ook voor dieren die [REDACTED] moet beschreven worden wanneer de dieren een HEP bereiken.
Een HEP kan gedefinieerd worden op basis van het hebben van open wonden die na behandeling niet genezen. Dat is de enige praktische situatie die zich zou kunnen voordoen op basis van de ervaring die we hebben. [REDACTED]
- Er wordt geen statistische onderbouwing gegeven en de DEC kan dan ook moeilijk inschatten of er vermindering mogelijk is. Er wordt gewerkt met groepen van 10 dieren maar men kan zich afvragen of dezelfde resultaten ook met 9 dieren bereikt zouden kunnen worden.
Er wordt wel een statistische onderbouwing gegeven op basis van het Handboek Proefdierkunde. Hoe dan ook is de praktische ervaring van groter belang en die leert dat kleinere groepsgrootten dan N=10 zeer frequent waarden van $P=0.06$ of $P=0.07$ als uitkomst geven van statistische vergelijkingen. Daarmee werken kleinere groepsgrootten in de hand dat resultaten nutteloos zijn en de proef alsnog met een grotere groepsgrootte moet worden overgedaan waardoor het principe van vermindering een averechts effect tot gevolg heeft.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud)


1. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. De DEC heeft mogelijk tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
In principe valt aal onder de Flora en Faunawet, maar er zijn uitzonderingen hierop volgens "Regeling Vrijstelling beschermde dieren- en plantensoorten Flora- en Faunawet":
 - *Van de verboden, bedoeld in de artikelen 9 en 10 van de wet, en het verbod op het onder zich hebben van beschermde inheemse diersoorten, bedoeld in artikel 13, eerste lid, van de wet, wordt vrijstelling verleend voor de aal (*Anguilla anguilla*).*

- *De vrijstelling, bedoeld in het eerste lid, is alleen van toepassing, indien kan worden aangetoond:*
 - *dat is voldaan aan het bij of krachtens de Visserijwet 1963 bepaalde, of*
 - *dat de aal in Nederland is gebracht of verkregen overeenkomstig het bij of krachtens de wet bepaalde en met inachtneming van de basisverordening en uitvoeringsverordening.*

Als de proefdieren gevangen worden door beroepsvissers vallen ze onder de Visserijwet aangezien dit het geval is prevaleert de Visserijwet boven de Flora en Faunawet.

3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van de aanvraag is het ontwikkelen van reproductie bij paling. Het uiteindelijke doel van de aanvraag is het verder brengen van de palingkweeksector met daarbij als indirect doel het behouden van de natuurlijke populatie.
De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belanghebbenden en hun morele waarden in het project zijn:
 - Proefdieren: aantasting van welzijn en integriteit
 - Doeldieren: wanneer het mogelijk is om paling te kweken zijn optimale houderij-omstandigheden belangrijk
 - Palingkweeksector: economisch belang
 - Onderzoeker/CRO: economisch belang
 - Ecologie: wanneer het mogelijk is om paling in gevangenschap te kweken hoeft er geen wildvang meer plaats te vinden en kan de palingpopulatie in stand blijven/zich herstellen.
 - Maatschappij: de maatschappij ziet graag een duurzame sector en herstel van de natuurlijke populatie
6. T.b.v. de voortplanting krijgt een deel van de paling 



De DEC heeft de onderzoeker informatie gevraagd over de mogelijke milieu-effecten. Het antwoord hierop is:



Proefopzet en haalbaarheid

7. De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn.
8. De DEC heeft vastgesteld dat het project goed is opgezet, en dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Hoewel ambitieus, is de opzet van het project goed doordacht en als PPS-project reeds door deskundigen goedgekeurd.

DATUM

28 februari 2017

ONS KENMERK

AVD401002017817

PAGINA

3 van 5

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: het betreft wildvang van een bedreigde diersoort. De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geëvalueerd.
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. De DEC stelt vast dat voor een groot deel van de proefdieren de cumulatieve inschatting van ongerief "licht" is. Voor de dieren die regelmatig geïnjecteerd worden is het ongerief "matig". Beide inschattingen zijn realistisch geëvalueerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit: bloed- en weefselafname, injectie met hormonen (ongerief bestaat daar met name uit hanteren van de dieren en bijkomen uit de verdoving), [REDACTED]
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen.
13. De DEC heeft vastgesteld dat, na aanpassing n.a.v. vragen van de DEC, de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en dat goed is ingeschat welk percentage van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken.

3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Voor de te onderzoeken factoren zijn geen proefdiervrije technieken beschikbaar.
15. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De dieren worden van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven.
19. De dieren worden gedood in het kader van het project. Er worden postmortem monsters verzameld. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag is of het belang van het ontwikkelen van de reproductie van alen in gevangenschap ten behoeve van de commerciële sector opweegt tegen het gebruik van deze beschermde dieren en het ongerief dat zij ondervinden. Hoewel het de onderzoeker niet gaat om de maatschappelijke belangen kan in de centrale morele vraag ook afgewogen worden of het ontwikkelen van een duurzame sector en het behoud van de natuurlijke palingpopulatie opwegen tegen het gebruik van deze aantallen beschermde dieren en het ongerief dat zij ondervinden.
2. De DEC acht de belangen voor de sector/economie substantieel en de belangen voor de overige belanghebbenden zoals die onder C5 genoemd worden reëel.
3. De DEC is van mening dat de centrale morele vraag met "ja" beantwoord kan worden.

E. Advies

1. Advies aan de CCD:
 - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Onderstaande knelpunten/dilemma's zijn naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies:
 - Zoals eerder aangegeven heeft de DEC haar twijfels over de haalbaarheid van de doelstelling. De DEC is echter van mening dat de belangen voor de sector en de ecologie dermate groot zijn dat dit het onderzoek rechtvaardigt.
 - De DEC heeft gediscussieerd over de wenselijkheid van een grootschalige palingkweeksector en komt tot de conclusie dat die houderij er reeds is en door de wildvang van glasaal mede ten koste van de natuurlijke populatie.

DATUM

28 februari 2017

ORIS KENMERK

AVD401002017817

PAGINA

5 van 5

Met vriendelijke groet,





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN
|||

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002017817
Bijlagen
1

Datum 21 maart 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 15 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Vermeerdering van Europese aal ter bevordering van duurzame aquacultuur" met aanvraagnummer AVD401002017817. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 20 maart 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft op ons verzoek de Niet Technische Samenvatting aangepast. Het aantal dieren dat nu is vermeld in de NTS is alleen het aantal dieren dat onder de WoD valt.

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 "Vermeerdering van Europese aal ter bevordering van duurzame aquacultuur" starten. De vergunning wordt afgegeven van 22 maart 2017 tot en met 31 december 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC WUR. Dit advies is opgesteld op 28 februari 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:
21 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002017817

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: 


I. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Wageningen Research

Adres: Postbus 59

Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN

Deelnemersnummer: 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 22 maart 2017 tot en met 31 december 2021, voor het project "Vermeerdering van Europese aal ter bevordering van duurzame aquacultuur" met aanvraagnummer AVD401002017817, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC WUR. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 15 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 2 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 28 februari 2017, ontvangen op 2 maart 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 20 maart 2017

Aanvraagnummer:
AVD401002017817

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 [REDACTED]				
	Andere vissen (andere Pisces) / [REDACTED] [REDACTED]	280	100% Licht	
3.4.4.2 [REDACTED]				
	Andere vissen (andere Pisces) / [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED] [REDACTED]	320	100% Licht	
3.4.4.3 [REDACTED]				
	Andere vissen (andere Pisces) / [REDACTED]	3.070	56% Matig 44% Licht	
3.4.4.4 [REDACTED]				
	Andere vissen (andere Pisces) / [REDACTED]	5.000	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

Aanvraagnummer:
AVD401002017817

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:

AVD401002017817

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:
AVD401002017817

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 W17-08										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 2017818	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x		x	x		
4	Bijlage				x		x	x		
5	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
6	Verzoek aanvulling				x		x	x		
7	Aanvullende informatie				x		x	x		
8	DEC advies			x						
9	Correspondentie				x		x	x		
10	Advies CCD		x						x	
11	Beschikking en vergunning				x		x	x		

116002017 & 18.



1.

23 FEB. 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	11600
		<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	Academisch Ziekenhuis Leiden
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Leids Universitair Medisch Centrum
		KvK-nummer	27366422
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	Albinusdreef 2
		Postbus	9600
		Postcode en plaats	2300 RC Leiden
		IBAN	NL11DEUT0451001400
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	LUMC
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]

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 568 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	[REDACTED]
Functie	[REDACTED]
Plaats	Leiden
Datum	20 - 02 - 2017
Handtekening	[REDACTED]



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
- 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.

Verskillende pathofysiologische veranderingen aan het hart kunnen leiden tot (dodelijke) hartritmestoornissen. De veranderingen uiten zich vooral in de volgende 3 pathologiën; i) hypertrofie (het groter wordt van de hartspiercel), ii) fibrosis of verbindweefseling (een toename in fibroblasten [bindweefselcellen]) en iii) oxidatieve stress (een toename in de productie van vrije zuurstofradicalen). Het is bekend dat deze 3 pathologiën ieder op hun eigen wijze tot elektrofysiologische veranderingen in de hartspiercel leiden en daarmee bijdragen aan een grotere kans op ritmestoornissen in zowel de boezems als kamers van het hart. Hoe dit precies gebeurt is echter niet duidelijk. Deze hartritmestoornissen (of aritmieën) zijn een groot en groeiend, wereldwijd probleem op zowel klinisch, wetenschappelijk als economisch vlak. Gezien de grote omvang van dit probleem is er de afgelopen decennia veel onderzoek gedaan naar hartritmestoornissen. Ondanks dat er door onderzoek meer bekend is over het ontstaan en de mechanismen achter hartritmestoornissen is de kennis nog verre van volledig. Mede door de tekortkomingen aan inzicht is de huidige behandeling van hartritmestoornissen relatief aspecifiek en beperkt. Deze behandelingen zijn gebaseerd op farmacologie, elektrische devices en weefselablatie. Zo heeft de farmacologische behandeling van hartritmestoornissen geen positieve invloed op de mortaliteit en heeft het een breed scala aan bijwerkingen zoals vermoeidheid, hypotensie, impotentie en schildklierafwijkingen. Tevens interacteren anti-aritmica vaak met andere medicijnen en kunnen deze medicijnen zelfs levensbedreigende hartritmestoornissen veroorzaken. Devices, zoals pacemakers en implantable cardiac defibrillators (ICDs), hebben hoge kosten en een groot risico op complicaties en device failure. Daarnaast worden de (vaak onterechte) electroshocks als zeer traumatiserend ervaren en kunnen deze shocks het hartweefsel beschadigen. Bij een ablatie wordt er middels een catheter opzettelijk hartspierweefsel vernietigd om zo de ritmestoornis te stoppen of te voorkomen. Echter is deze optie bij een grote populatie niet mogelijk daar dieper gelegen pro-aritmische hartweefsel vaak niet met de ablatie katheter bereikt kan worden. Gezien de invasieve aard van de ingreep is er een reële kans op complicaties zoals hart tamponade, CVA en vaatschade. Tevens kan er door het vernietigen van hartweefsel onomkeerbare geleidingsstoornissen ontstaan waardoor levenslange behandeling met een pacemaker noodzakelijk is.

Gezien het suboptimale karakter van de huidige therapieën zijn meer specifieke en effectieve behandelingen voor hartritmestoornissen wenselijk. Een alternatieve strategie voor de behandeling van aritmieën is een biologische therapie die de pathofysiologische processen van zieke hartspiercellen van binnenuit aanpakt op specifieke wijze. Een manier om dit te bewerkstelligen is door middel van genterapie, waarbij middels een vector (bijvoorbeeld virale deeltjes) genetisch materiaal de cel wordt ingebracht, waardoor de eigenschappen van de cel op specifieke en voordelige wijze kunnen worden veranderd. Door de zeer specifieke benadering van genterapie neemt de effectiviteit van de behandeling wellicht toe, terwijl met deze therapie het risico op bijwerkingen en complicaties significant zou kunnen afnemen. Nog belangrijker, door mogelijk herstel van de normale werking van de hartspiercel, biedt genterapie kans op genezing, iets dat met de huidige therapieën niet bereikt kan worden daar het alleen de symptomen bestrijdt. Samenvattend is er, gezien de ernstige tekortkomingen van de huidige therapieën, een significante en zeer welkome verbetering te verwachten met de ontwikkeling van genterapie voor hartritmestoornissen. Het potentieel van genterapie voor hartfalen wordt reeds onderzocht in enkele klinische studies (Hulot JS *et al.* Eur Heart J. 2016), echter is er tot op heden nog onvoldoende inzicht in moleculaire en cellulaire mechanismen die ten grondslag liggen aan hartritmestoornissen om genterapie toe te passen. Om dit te bereiken is het noodzakelijk een beter mechanistisch inzicht te verkrijgen in hartritmestoornissen als gevolg van hypertrofie, fibrosis of oxidatieve stress, om zo aangrijpingspunten te identificeren die vervolgens middels genterapie worden onderzocht op hun therapeutisch potentieel. Om dit op een gestructureerde, controleerbare doch flexibele wijze te onderzoeken is eerst *in vitro* onderzoek nodig, omdat dit type onderzoek deze condities inderdaad weet te creëren, zoals ook uit ons eerdere onderzoek is gebleken.

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?

De hoofddoelstelling van dit project richt zich op de vraag hoe de veranderingen in elektrische eigenschappen van hartspiercellen (zowel atriale als ventriculaire), als gevolg van hypertrofie, fibrosis of oxidatieve stress, door middel van genetische interventies dusdanig kunnen worden aangepast zodat hiermee een positief effect (d.w.z. beëindigen/voorkomen) op hartritmestoornissen kan worden

bewerkstelligd. Om deze hoofddoelstelling te bereiken worden zowel *atriale als ventriculaire hartspiercellen uit twee dagen oude ratten pups* gebruikt om *in vitro* modellen van ritmestoornissen (als gevolg van hypertrofie, fibrosis of oxidatieve stress) te produceren om deze vervolgens te onderzoeken op potentiële aangrijpingspunten voor genterapeutische interventies, waarna deze interventies worden uitgevoerd om zo te vast te stellen of en hoe dit leidt tot het beëindigen dan wel voorkomen van de ritmestoornis.

De haalbaarheid van het project wordt gesteund door onze ruime ervaring met zowel het gebruik van cellen uit het neonatale ratten hart als de genterapeutische technieken en read-out systemen beschreven in dit projectvoorstel ([REDACTED]).

[REDACTED] *In vitro* modellen gebaseerd op deze cellen hebben bij ons, maar ook bij anderen, aan de basis gestaan van belangrijke inzichten, getuige het grote aantal publicaties in gerenommeerde wetenschappelijke tijdschriften, proefschriften en subsidies ([REDACTED]).

3.3 Belang

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

Medisch belang: Hartritmestoornissen blijven wereldwijd een groot en toenemend probleem, met hoge mortaliteit- & morbiditeitgraad en enorme ziektekosten. Atriumfibrilleren (of boezemfibrilleren) komt bijvoorbeeld voor in 2-3% van de populatie, voornamelijk in de populatie van 65 jaar en ouder, waarvan spoedig 1 op de 5 deze hartritmestoornis zal hebben. Ook het aantal patiënten met ventrikelfibrilleren (kamerfibrilleren) is enorm: plotselinge hartdood als gevolg van kamerfibrilleren of een hartstilstand is goed voor ±18% van alle sterfgevallen in de Westerse wereld. Naast sterfte, dragen deze stoornissen ook bij aan de verdere verslechtering van het hart, doordat de perfusie van de hartspier tijdens de ritmestoornis ernstig wordt belemmerd en het weefsel dus niet kan worden voorzien van voldoende zuurstof. Als gevolg van de incidentie en ernst van deze stoornissen wordt alleen al in Europa jaarlijks meer dan €170 miljard uitgegeven aan cardiovasculaire aandoeningen, waarvan een significant deel aan bovengenoemde hartritmestoornissen. Gezien de toenemende leeftijdsverwachting en vergrijzing wordt verwacht dat deze aantallen in de nabije toekomst scherp toenemen. Daar genterapie kans biedt op genezing zal succesvolle toepassing van deze vorm van therapie een significante bijdrage leveren aan de mortaliteit en kwaliteit van leven van patiënten met hartritmestoornissen.

Maatschappelijk belang: Patiënten met hartritmestoornissen hebben veelal levenslange medicamenteuze behandelingen nodig, met als enig alternatief bijzonder kostbare medische interventies als operatieve ablatie of implantatie van een pacemaker of implanteerbare defibrillator. Aangezien bijna alle vormen van anti-aritmische therapie levenslang nodig zijn, zullen de kosten - met het oog op de vergrijzing - alleen maar verder toenemen. Dit maakt dat hartritmestoornissen een grote en langdurende nadelige impact op de maatschappij heeft. Daarnaast is het van belang om aan te geven dat de consequenties van deze stoornissen, ondanks behandeling, een significante invloed kan hebben op de gezondheid van de patiënten, zoals herseninfarcten en sterk verminderde lichamelijke conditie. Tenslotte zijn er een tal van ernstige bijwerkingen van de medicamenteuze therapie van ritmestoornissen die een nieuwe behandeling zonder deze bijwerkingen noodzakelijk maakt. Nieuwe behandelingsmogelijkheden die mogelijk maken dat hartritmestoornissen daadwerkelijk in de kern kunnen worden aangepakt, zoals bij genterapie, kunnen dus ook een bijzonder grote positieve impact hebben op de maatschappij, en niet alleen in Nederland, maar wereldwijd.

Wetenschappelijk belang:

Ons begrip van hartritmestoornissen is relatief beperkt. Dit project richt zich op de ontdekking van nieuwe aangrijpingspunten van hartritmestoornissen *in vitro* en de ontwikkeling van gerichte genetische interventies die de ritmestoornis tegengaat. Bij het behalen van deze doelstelling draagt dit project bij aan het wetenschappelijk inzicht van hartritmestoornissen maar tevens ook aan de behandeling daarvan. De wetenschappelijke bijdrage van dit project kan daarmee een goede basis vormen voor toekomstig *in*

vivo onderzoek gericht op genetische interventies tegen hartritmestoornissen.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Om antwoord te geven op de vraag hoe de elektrische eigenschappen van atriale en ventriculaire hartspiercellen, in een setting van hypertrofie, fibrosis of oxidatieve stress, door middel van genetische interventie positief kunnen worden aangepast teneinde de uiting van ritmestoornissen te kunnen voorkomen, remmen of termineren zijn de volgende 2 onderdelen opgezet:

(i) Het karakteriseren van ziektemodellen.

Met hartspiercellen geïsoleerd uit neonatale ratten pups kan *in vitro* i) hypertrofie (door toevoeging van fenylefrine), ii) verbindweefseling (door hartspiercellen te kweken met bindweefselcellen) en iii) oxidatieve stress (door een eiwit tot expressie te brengen dat onder invloed van licht vrije zuurstof radicalen produceert via genetische modificatie) worden nagebootst met als gevolg dat het ritme van deze hartspiercellen verstoord raakt. Om therapeutische aangrijpingspunten voor deze aritmieën te identificeren is het nodig om deze ziektemodellen in detail te onderzoeken middels verschillende elektrofysiologische (whole-cell patch clamp, multi-electrode mapping en optical voltage en calcium mapping) en biochemische (polymerase chain reaction [PCR], Western blot, immuno- and chemocytologie, flowcytometrie, transcriptoom en proteoom analyses) technieken, waarbij wij ons in het bijzonder richten op de volgende eiwitgroepen; *ion kanalen* (omdat deze eiwitten aan de basis staan van de elektrofysiologie in de hartcel), *connexines* (omdat deze koppelingseiwitten communicatie tussen hartcellen mogelijk maakt), *groei- en proliferatiefactoren* (omdat deze eiwitten essentieel zijn in het onderhouden van gezond hartweefsel) en Ca^{2+} huishouding (omdat deze eiwitten de intracellulaire concentratie Ca^{2+} reguleren en daarmee bijdragen aan optimale hartfunctie). Wij richten ons primair op deze eiwitten omdat hiervan bekend is dat deze een belangrijke rol spelen in het elektrisch functioneren van hartweefsel. Naast de identificatie/modificatie benadering zullen de verstoorde elektrofysiologische processen ook op directe wijze worden gemoduleerd door gebruik te maken van lichtgevoelige eiwitten (o.a. ion kanalen). Deze technologie wordt *optogenetics* genoemd en maakt het mogelijk om biologische processen, inclusief elektrofysiologische processen, op precieze wijze te controleren door de expressie en activatie van deze licht-gevoelige eiwitten. Wij hebben reeds ervaring met de hierboven genoemde modellen, maar een uitgebreider mechanisch inzicht op cellulair niveau is essentieel om potentiële therapeutische aangrijpingspunten voor genterapie te kunnen ontdekken.

(ii) Het testen en evalueren van genetische interventies ten behoeve van het voorkomen en termineren van hartritmestoornissen.

Nadat de verschillende *in vitro* modellen in detail zijn gekarakteriseerd zullen associaties worden onderzocht tussen veranderingen op moleculair/cellulair niveau en de afwijkingen op elektrofysiologisch gebied. Na het rangschikken op sterkte van associatie zullen verschillende genetische interventies worden ontwikkeld voor een specifieke factor, waarbij wij ons in beginsel richten op de eerder genoemde ion kanalen, connexines, groei- en proliferatiefactoren en de Ca^{2+} huishouding. Bij de identificatie van zo'n potentieel therapeutisch aangrijpingspunt zal middels genetische interventies worden getracht deze dusdanig te modifieren, zowel in functionaliteit als expressieniveau, om het causale verband tussen de specifieke factor en de elektrofysiologische afwijkingen te onderzoeken. De genetische interventies zullen plaatsvinden door het gebruik van virale (lenti, retro, adeno, adeno-geassocieerde) en niet-virale (plasmide) vectoren afhankelijk van de aard van de factor die wordt geïdentificeerd. Genetische interventies met een significant corrigerend effect en hoog therapeutisch potentieel en laag risico op bijwerkingen zullen in aanmerking komen voor toekomstige vervolgentoelagen.

Naast deze factor-specifieke benadering zullen de verstoorde elektrofysiologische processen ook door het gebruik van lichtgevoelige eiwitten worden gemodificeerd. Nadat deze eiwitten tot expressie zijn gebracht zullen de vervolgens worden geactiveerd met licht, waardoor op exacte wijze kan worden bepaald waar, op welke moment en met welke intensiteit, voor hoe lang een bepaald elektrofysiologisch proces wordt gecontroleerd (bijvoorbeeld de membraanspanning van de hartspiercellen). De invloed van deze optogenetische interventies in de 3 verschillende modellen wordt met dezelfde technieken in kaart

gebracht. Door de elektrofysiologische processen te beïnvloeden middels zowel factor-specifieke als proces-specifieke interventies zal een dieper mechanistisch inzicht worden verkregen en kan tevens worden vastgesteld welke genetische interventie het meest effectief is in het verminderen van de ritmestoornissen.

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

De hoofdlijnen van het project zijn:

- (i) Het onderzoeken van *in vitro* ziektemodellen waarvan bekend is dat deze leiden tot hartritmestoornissen. Hierbij gaat het om hypertrofie van hartspiercellen, fibrose van de hartspiercelkweek en het induceren van oxidatieve stress in kweken van atriale en ventriculaire hartspiercellen. Om deze modellen te kunnen produceren zijn cellen nodig, zoals eerder beschreven wordt hiervoor gebruik gemaakt van neonatale rattenpups. We gebruiken rattenpups van twee dagen oud, omdat de hartspiercellen van deze pups resulteren in een hoge kwaliteit van celkweken en ook het langst in kweek te houden zijn. De neonatale ratten pups zullen, voorafgaand aan adequate volledige anesthesie en de daarop volgende decapitatie en excisie van de harten, geen aanvullende behandeling/interventie ondergaan.
- (ii) Het testen van genetische interventies ten behoeve van het voorkomen en termineren van hartritmestoornissen. Deze genetische interventies zullen getest worden op de pro-aritmische ziektemodellen die hierboven beschreven zijn. Genetische interventies vinden enkel *in vitro* plaats. NB: Bij de productie van vectoren die leiden tot genetische modificaties wordt geen gebruik gemaakt van proefdieren.

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.

Om het aantal dieren tot een minimum te beperken zullen eerst aangrijpingspunten in de ziektemodellen worden geïdentificeerd, zodat de kans aanzienlijk groter is dat er een (positief) effect op het ritme van de hartspiercellen kan worden vastgesteld. Vervolgens zal de specifieke rol van deze aangrijpingspunten of factoren in de ritmestoornissen worden onderzocht middels genetische interventies. De mijlpalen hierbij zijn: a) het karakteriseren van de ritmestoornis en het onderliggende moleculaire en cellulaire substraat in de 3 ziektemodellen, om b) hieruit vervolgens aangrijpingspunten te identificeren, deze te prioriteren en de hierop van toepassing zijnde genetische interventies te ontwikkelen, waarna ten slotte c) wordt bestudeerd in welke mate en hoe deze interventies de ritmestoornissen weten te voorkomen dan wel te termineren. Wanneer in fase i van een van de ziektemodellen geen sterke aangrijpingspunten gevonden worden zal fase ii van dat ziektemodel niet doorgaan.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Excisie van neonatale ratten harten uit gezonde twee dagen oude neonatale ratten pups na decapitatie onder volledige anesthesie en afwezigheid pijnreflex.
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.	11600	
1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Leids Universitair Medisch Centrum	
1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	1	Excisie van neonatale ratten harten

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.

Er wordt gebruik gemaakt van twee dagen oude ratten pups. De harten van deze pups worden direct na adequate anesthesie en decapitatie uitgenomen. Uit deze neonatale ratten harten worden spiercellen (cardiomyocyten) uit zowel de atria als ventrikels geïsoleerd. Uit uitgebreid onderzoek van onze onderzoeksgroep en groepen wereldwijd is gebleken dat het gebruik van neonatale ratten harten hartspiercellen oplevert die tot 2 weken lang in kweek gehouden kunnen worden zonder verlies van fenotype en dusdanig robuust zijn dat de geplande interventies plaats kunnen vinden. Primaire uitkomstparameter: isolatie en in kweek houden van levende cardiomyocyten afkomstig uit neonatale ratten pups.

Na het isoleren van de hartspiercellen worden deze uitgeplaat in petrischalen met een doorsnede van 15 mm. In deze kweken is 80% van de cellen hartspiercel en 20% fibroblast. Deze cellen worden 12 uur na uitplaten behandeld met een cytostaticum (mitomycine-c) om overgroeiing door fibroblasten te voorkomen. De kweken worden vervolgens i) blootgesteld aan stimuli om de kweken hypertroof te maken, ii) voorzien van additionele fibroblasten (om de kweken fibrotisch te maken), of iii) getransduceerd met lentivirale vectoren om eiwitten tot expressie te brengen die onder invloed van licht vrije zuurstof radicalen gaan produceren (om oxidatieve stress te veroorzaken). Als controles worden kweken gebruikt met medium zonder deze specifieke reagentia of met "lege" lentivirale vectoren. Na 4-9 dagen maturatie van de kweek bestuderen wij A) hoe en in welke mate de verschillende protocollen hebben bijgedragen aan elektrofysiologische veranderingen en daarmee hebben geleid tot ritmestoornissen in de celkweken. Om vervolgens B) te onderzoeken welke moleculaire en cellulaire factoren hieraan ten grondslag liggen, waarna C) specifieke genetische interventies worden ontwikkeld om deze factoren te kunnen modifieren middels down- of upregulatie van de desbetreffende eiwitten. Naast deze factor-specifieke benadering om een beter inzicht te krijgen in de onderliggende pro-arrhythmische mechanismen en te bepalen welke genetische

modificatie welk therapeutisch potentieel heeft, zullen ook D) specifieke elektrofysiologische processen op directe wijze worden gemoduleerd door gebruikt te maken van lichtgevoelige eiwitten (optogenetics). Het zal hier in het bijzonder gaan om lichtgevoelige ion kanalen, waarmee bijvoorbeeld het membraan van de cellen zowel kan worden gedepolariseerd (minder negatief voltage) als gehyperpolariseerd (meer negatief). Deze aanpak stelt ons in staat om op precieze wijze de elektrofysiologie van de celweek in zowel tijd als ruimte te controleren om daarmee eveneens het ontstaan en de terminatie van ritmestoornissen te onderzoeken ten einde de genterapeutische interventies te testen op hun therapeutisch potentieel. Het in kaart brengen van de effecten zal plaatsvinden conform de eerder beschreven experimenten.

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.

De moederdieren zullen drie weken zwanger zijn. Wanneer er vervolgens een nest geboren wordt, zullen 2 pups bij de moeder achterblijven om de lactatie in gang te houden en de kans op mastitis te verkleinen. Deze pups en de moeders blijven dus in leven. De overige pups worden gebruikt voor het experiment.

De pups worden verdoofd door middel van isofluraan. Door het controleren van de voetreflex wordt de verdoving geverifieerd. Vervolgens worden de pups gedood middels decapitatie, waarna de kopjes direct in de vloeibare stikstof worden geplaatst. Vervolgens wordt de thorax opengeknipt waarna het hart wordt uitgenomen. In totaal duurt deze procedure 5 minuten.

Deze aanpak laat toe dat het hart pijnloos, snel en doeltreffend kan worden uitgenomen met maximale levensvatbaarheid van de hartspiercellen die vervolgens uit het hart geïsoleerd zullen worden voor onderzoek.

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

De experimenten worden uitgevoerd in 24-wells platen met een doorsnede van 15 mm per well. Deze wells hebben het kleinste formaat waarbij elektrofysiologische eigenschappen van de cellen inclusief het optreden van ritmestoornissen bestudeerd kan worden. Aangezien voor de opzet van dit onderzoek een confluerende (aaneengesloten) monolaag vereist is, zodat geleiding en ritmestoornissen kunnen worden onderzocht, is een celdichtheid van 800.000 cellen/well noodzakelijk. Lagere celdichtheden zorgen voor structurele inhomogeniteit hetgeen de normale geleiding van de elektrische signalen verslechtert. Deze celdichtheid is gebaseerd op uitvoerige testen en is tevens nodig om voldoende fluorescent signaal te verkrijgen bij de optical mapping experimenten, zodat betrouwbare metingen kunnen worden uitgevoerd. Voor moleculaire en cellulaire analyses - bijvoorbeeld Western blotting, PCR, kleuringen - die parallel aan de optical mapping experimenten dienen te worden uitgevoerd, worden respectievelijk 0,8 , 0,5 , en 0,1 miljoen cellen per well gebruikt. Per neonataal rattenhartje worden gemiddeld zo'n 3 miljoen ventriculaire hartspiercellen en 0,5 miljoen atriale cardiomyocyten geïsoleerd. Door zowel ventriculaire als atriale cellen uit hetzelfde hartje te isoleren wordt deze optimaal gebruikt. Tijdens de isolatieprocedure worden ook de bindweefselcellen uit de hartjes geïsoleerd. Zodoende hoeven er, wanneer er voor het fibrosemodel bindweefselcellen nodig, geen extra proefdieren te worden gebruikt.

B. De dieren

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

Diersoort: Rat, Wistar.

Er is voor neonatale Wistar pups gekozen omdat i) wij gebruik maken van volwassen Wistar ratten voor onze *in vivo* experimenten (geen onderdeel van deze aanvraag, beschreven in DEC14115 + DEC12095) en daarmee de bevindingen van het *in vitro* onderzoek later makkelijk vertaald kunnen worden naar eventueel *in vivo* onderzoek en ii) deze ratten binnen het proefdiercentrum van de instellingsvergunninghouder gefokt worden en daarmee vraag en aanbod voor de experimenten op elkaar afgestemd kan worden.

Herkomst: fok van instellingsvergunninghouder.

Levensstadia en geslacht:

- Adult: vrouwelijke moederdieren. Deze dieren zullen niet worden gedood.
- Pups: 2 dagen oud, zowel mannetjes als vrouwtjes. Voor de vervollexperimenten zijn hartcellen nodig die twee weken in kweek kunnen worden gebracht met behoud van functionele en structurele eigenschappen. Dit kan alleen maar worden bereikt met cellen uit neonatale ratten harten,

aangezien hartspiercellen geïsoleerd uit adulte dieren *in vitro* maar ongeveer 2 dagen blijven leven.

Geschatte aantallen:

De geschatte nestgrootte is 10 pups. Aangezien er twee pups bij de moeder achterblijven gaan wij uit van 8 pups per moederdier die voor de vervolggexperimenten gebruikt kunnen worden. Zoals eerder aangegeven worden per neonataal rattenhartje gemiddeld zo'n 3 miljoen ventriculaire hartspiercellen en 0,5 miljoen atriale cardiomyocyten geïsoleerd.

Om de 3 verschillende ziektemodellen met controles te onderzoeken wordt er, zoals eerder beschreven, A) elektrofysiologisch (optical mapping) en B) moleculair en cellulair (Westernblot, PCR en immunokleuringen) onderzoek verricht om zo aangrijpingspunten voor genterapeutische interventies te identificeren. Dit onderzoek zal het eerste jaar in beslag nemen, omdat wij uit ervaring weten dat binnen 1 jaar voldoende inzicht kan worden verkregen om targets te identificeren voor vervolgonderzoek als de isolaties 40 keer per jaar plaatsvinden met de hieronder beschreven hoeveelheden cellen. Per isolatieronde gebruiken we voor de optical mapping experimenten en Western blot (waarbij dezelfde cellen worden gebruikt) 1,5 x 24-wells platen met 0,8 miljoen cellen per well, voor PCR 0,5 x 24-well plaat met 0.5 miljoen cellen per well, voor kleuringen 0,5 x 24-well plaat met 0,1 miljoen cellen per well. Dit betekent dat per week $1,5 \times 24 \times 0,8 + 0,5 \times 24 \times 0,5 + 0,5 \times 24 \times 0,1 = 36$ miljoen ventriculaire hartspiercellen nodig zijn. Hiervoor gebruiken wij 36 miljoen / 3 miljoen cellen per hartje = 12 neonatale rattenpups. Dit maakt dat wij $36 \times 0,5 = 18$ miljoen atriale hartspiercellen kunnen gebruiken voor het onderzoek naar boezemfibrilleren. Voor deze experimenten (A en B) wordt dezelfde ratio als voor de ventriculaire cellen aangehouden en dit geldt voor alle hieronder beschreven experimenten. Dit betekent dat voor de 3 groepen (hypertrofie, fibrosis en oxidatieve stress), $3 \times 12 = 36$ pups per week nodig zijn en dus 36×40 weken = 1440 neonatale rattenpups. Aan de hand van ervaring verwachten wij in dit jaar 6 aangrijpingspunten per ziektemodel te vinden.

C) Nadat de aangrijpingspunten in de hierboven beschreven studies zijn geïdentificeerd (geschat op 18 in totaal), zullen deze gedurende de volgende 2 jaar op systematische wijze worden onderzocht middels genetische interventies. Ervaring heeft ons geleerd dat om de therapeutische relevantie van 1 target te onderzoeken wij de volgende hoeveelheden cellen 40 maal per jaar nodig hebben; voor de optical mapping experimenten en Western blot 0,50 x 24-wells platen met 0,8 miljoen cellen per well, voor PCR 0,16 x 24-well plaat met 0.5 miljoen cellen per well, voor kleuringen 0,16 x 24-well plaat met 0,1 miljoen cellen per well. Dit betekent dat per week $0,50 \times 24 \times 0,8 + 0,16 \times 24 \times 0,5 + 0,16 \times 24 \times 0,1 = 12$ miljoen ventriculaire hartspiercellen nodig zijn. Hiervoor gebruiken wij $12/3 = 4$ neonatale rattenpups. Dat maakt 4×40 weken = 160 pups per target x 6 targets x 3 ziektemodellen = 2880 neonatale rattenpups.

In de laatste fase D) zal middels optogenetische interventies de functionaliteit van de meest veelbelovende targets op precieze wijze worden onderzocht, zodat dieper mechanistische inzicht kan worden verkregen. Wij verwachten 2 targets over te houden per ziektemodel, dus 6 in totaal. Ervaring leert ons wij voor deze experimenten ongeveer 1 jaar nodig te hebben om duidelijk inzicht te krijgen, waarbij 40 maal per jaar de cellen beschikbaar zijn voor de volgende onderzoeken; voor de optical mapping experimenten en Western blot 0,75 x 24-wells platen met 0,8 miljoen cellen per well, voor PCR 0,24 x 24-well plaat met 0.5 miljoen cellen per well, voor kleuringen 0,24 x 24-well plaat met 0,1 miljoen cellen per well. Dit betekent dat per week $0,75 \times 24 \times 0,8 + 0,24 \times 24 \times 0,5 + 0,24 \times 24 \times 0,1 = 18$ miljoen ventriculaire hartspiercellen nodig zijn. Hiervoor gebruiken wij $18/3 = 6$ neonatale rattenpups. Dat maakt 6×40 weken = 240 pups per target x 6 targets = 1440 neonatale rattenpups.

Uiteindelijk maakt dit dat in totaal; 1440 pups (A-B; 1 jaar) + 2880 pups (C; 2 jaar) + 1440 pups (D; 1 jaar) = 5760 2-dagen oude neonatale pups nodig zijn om de doelstelling te behalen. Het betreft hier een groot project dat een belangrijke basis vormt voor het pre-klinisch onderzoek naar hartritmestoornissen in het LUMC.

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:

Recentelijk zijn hartspiercellen afgeleid van humane embryonale stamcellen en humane geïnduceerde pluripotente stamcellen naar voren gekomen als nieuw modelsysteem voor het studeren van hartziekten. Wegens de ethische bezwaren tegen het gebruik van embryonale stamcellen wordt op dit moment gefocust op de geïnduceerde stamcellen. Ondanks het grote potentieel, hebben deze cellijnen ook serieuze nadelen waardoor ze nog niet geschikt zijn als alternatief voor de in deze aanvraag beschreven dierproeven. Ten eerste is het differentiëren van de pluripotente stamcellen naar hartspiercellen niet erg efficiënt en leidt dit tot heterogene populaties. Daarnaast gaat alle epigenetische informatie tijdens het proces verloren, welke juist invloed kan hebben op het ontstaan van cardiovasculaire ziekten. Tevens is het genereren van pluripotente stamcellen, laat staan een enigszins homogene populatie hartspiercellen hieruit, erg tijdrovend en duur proces, aangezien o.a. instabiele groeifactoren moeten toegevoegd op specifieke tijdstippen. Wanneer deze nadelen overkomen kunnen worden of er anderszins gegenereerde cellijnen beschikbaar komen die (elektro)fysiologisch goed vergelijkbaar zijn met primaire hartspiercellen, zullen wij uiteraard hierop overstappen.

Daarnaast is ons laboratorium enkele jaren geleden een samenwerking aangegaan met de [REDACTED]. In samenwerking met [REDACTED] wordt gewerkt aan verdere verbetering van *in silico* modellen (computermodellen voor simulaties) van het hartspiercellen en het hele hart. Deze *in silico* modellen worden gebruikt om resultaten voor de *in vitro* en *in vivo* experimenten te voorspellen, waarmee proefdieren worden vervangen. Tevens is met [REDACTED] gewerkt aan een verbetering van de analyse van de verkregen data, waardoor de hoeveelheid gegevens per onderzochte well groter en waardevoller wordt.

Vermindering:

Ter vermindering maken wij zo optimaal mogelijk gebruik van ieder hartje. Zowel de boezems als kamers worden gebruikt en ook de fibroblasten (bindweefselcellen) worden in kweek gehouden voor onderzoek. Ook eventuele referentieorganen voor eiwit- of genexpressie analyse wordt uit dezelfde neonatale ratjes gehaald. Zoals hierboven aangegeven houden wij ons intensief bezig met computersimulaties om zo proefdieren te vervangen. Deze simulaties zorgen echter ook voor een vermindering van het aantal proefdieren dat nodig is om een onderzoeksvraag te beantwoorden, omdat middels deze simulaties kan worden voorspeld welke *in vitro* experimenten bijdragen aan de beantwoording van de hoofddoelstelling ([REDACTED])). Experimenten waarvan aangenomen kan worden dat deze hier niet aan bijdragen zullen dus bij voorkeur niet worden uitgevoerd.

Verfijning:

Na de bevalling blijven 2 pups per nest bij de moeder, zodat de kans op stuwings bij de moeder wordt verkleind. Hiermee wordt de stress van de moeder en de kans op mastitis (als gevolg van stuwings) verlaagd. De pups die voor de experimenten worden gebruikt worden volledig verdoofd voordat het hart uitgehaald wordt, hier zullen zij dus geen pijn aan ondervinden. Daarnaast controleren diervverzorgers dagelijks op ongerief.

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.

Voor de moederdieren wordt angst en pijn tot een minimum beperkt door 2 pups per nest bij de moeder te laten. Hierdoor ondervindt zij minder stress van het wegnemen van de overige pups en wordt het risico op stuwings en mastitis beperkt.

De pups worden onder volledige anesthesie en middels decapitatie geofferd. De anesthesie wordt voorafgaand eerst gecontroleerd middels een pijnprikkel.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

De pups worden eerst volledig verdoofd met isofluraan, waarna decapitatie plaatsvindt om vervolgens het hart uit te nemen. De moederdieren hebben geen pijnbestrijding nodig.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

In overleg met de IvD is vastgesteld dat er geen ongerief wordt voorzien bij de moederdieren omdat de pups snel postpartum worden meegenomen. De lactatie is dan nog niet volledig op gang en de twee pups die achterblijven in het nest moeten voldoende zijn om de moeder te ontlasten van stuwning.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Niet van toepassing.

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

Na de bevalling blijven 2 pups per nest bij de moeder zodat zij minder stress ervaart en het risico op stuwning wordt verminderd. Daarnaast controleren diervverzorgers dagelijks op ongerief.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

K. Classificatie van ongerief

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

Licht ongerief.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Voor de proeven moeten primaire hartcellen worden geïsoleerd uit het neonatale rattenhart. Daartoe moet het hart worden uitgenomen. **De neonatale ratten worden voor uitname van het hart gedecapiteerd. Er wordt gekozen voor decapitatie omdat inerte gassen als N2 en argon niet op het LUMC proefdiercentrum aanwezig zijn en CO2 asfyxie niet op neonaten toepasbaar is wegens hun ongevoeligheid voor hypoxie. Tevens is een overdosis anesthesie bij de neonatale pups niet gewenst omdat dit de kwaliteit van het hartweefsel negatief kan beïnvloeden.**

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

Academisch Ziekenhuis Leiden
Leids Universitair Medisch Centrum

Postbus 9600

2300 RC LEIDEN



**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
AVD116002017818

Bijlagen

2

Datum 23 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer ██████████,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 21 februari 2017. Het gaat om uw project "Onderzoek naar de pathofysiologie van ritmestoornissen in kweekmodellen van ratten hartspiercellen voor de ontwikkeling van genetische interventies.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD116002017818. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

23 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD116002017818

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
23 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002017818

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11600
Naam instelling of organisatie: Academisch Ziekenhuis Leiden
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: Mevr. Leids Universitair Medisch Centrum [REDACTED]
KvK-nummer: 27366422
Straat en huisnummer: Albinusdreef 2
Postbus: 9600
Postcode en plaats: 2300 RC LEIDEN
IBAN: NL11DEUT0451001400
Tenaamstelling van het rekeningnummer: LUMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
23 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002017818

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]

Functie: [REDACTED]

Afdeling: [REDACTED]

Telefoonnummer: [REDACTED]

E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 maart 2017

Geplande einddatum: 28 februari 2021

Titel project: Onderzoek naar de pathofysiologie van ritmestoornissen in kweekmodellen van ratten hartspiercellen voor de ontwikkeling van genetische interventies.

Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar genetische interventies voor hartritmestoornissen in celkweekmodellen.

Naam DEC: DEC Leiden

Postadres DEC: [REDACTED] LUMC Postbus 9600 2300 RC Leiden

E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 568,-

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: Leiden
Datum: 20 februari 2017

Datum:
23 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002017818

[Redacted]

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 27 februari 2017 15:55
Aan: [Redacted]
Onderwerp: vragen aan aanvrager bij AVD116002017818

Geachte leden van DEC lumc,

Bij de CCD is een aanvraag tot projectvergunning gedaan waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Onderstaande vragen zijn nog aan de aanvrager voorgelegd. Wanneer u hierover aanvullend wilt adviseren dan horen wij dat graag,

Vriendelijke groet [Redacted]

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend waar bij de behandeling nog een paar vragen zijn. Het betreft uw project AVD116002017818: Onderzoek naar de pathofysiologie van ritmestoornissen in kweekmodellen van ratten hartspiercellen voor de ontwikkeling van genetische interventies.

U beschrijft het ongerief als terminaal, dit is niet correct. Wanneer de dieren eerst gedood worden en pas daarna de organen, in dit geval het hart, verwijderd worden wordt dit gezien als licht ongerief. Kunt u dit in de bijlage dierproeven en de Niet Technische Samenvatting aanpassen?
U beschrijft in de bijlage dierproeven onder K. dat de moeders licht ongerief ondervinden, wanneer dit het geval is, dan zijn de moederdieren onderdeel van dit projectvoorstel en moet u het aantal dieren opnemen onder B. Kunt u in overleg met de IvD vaststellen of de moederdieren drempel overschrijdend ongerief zullen ondervinden?

Uit het advies van de DEC volgt dat u de rattenpups dood door middel van decapitatie, waarna de kop in stikstof wordt gedompeld. Hoewel decapitatie als dodingsmethode is opgenomen in bijlage IV van de richtlijn , mag dit slechts toegepast worden wanneer is onderbouwd dat andere methoden niet geschikt zijn. Kunt u deze onderbouwing nog toevoegen onder punt L. in de bijlage dierproeven?

Kunt u in de NTS onder 3.6 de zin 'de dieren zullen overlijden onder narcose' herformuleren naar 'de dieren worden gedood onder narcose' ?

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 mevrouw ██████,

Recent hebben wij een aanvraag tot projectvergunning (*project AVD116002017818: Onderzoek naar de pathofysiologie van ritmestoornissen in kweekmodellen van ratten hartspiercellen voor de ontwikkeling van genetische interventies*) bij de CCD ingediend.

Hartelijk dank dat onze aanvraag in behandeling is genomen. U heeft ons vorige week per e-mail geschreven dat de CCD een aantal vragen had alvorens de projectvergunning aanvraag besproken kan worden. In deze brief vind u het commentaar van de CCD voorzien van ons antwoord:

Opmerking 1:

“U beschrijft het ongerief als terminaal, dit is niet correct. Wanneer de dieren eerst gedood worden en pas daarna de organen, in dit geval het hart, verwijderd worden wordt dit gezien als licht ongerief. Kunt u dit in de bijlage dierproeven en de Niet Technische Samenvatting aanpassen?”

Antwoord 1:

De classificering van het ongerief in de bijlage dierproeven en de Niet Technische Samenvatting is gewijzigd van “terminaal” naar “licht ongerief”.

Opmerking 2:

“U beschrijft in de bijlage dierproeven onder K. dat de moeders licht ongerief ondervinden, wanneer dit het geval is, dan zijn de moederdieren onderdeel van dit projectvoorstel en moet u het aantal dieren opnemen onder B. Kunt u in overleg met de IvD vaststellen of de moederdieren drempel overschrijdend ongerief zullen ondervinden?”

Antwoord 2:

In het overleg met de IvD is vastgesteld dat de moederdieren geen ongerief ondervinden omdat de pups snel postpartum worden meegenomen. De lactatie is dan nog niet volledig op gang en de twee pups die in het nest achterblijven moeten voldoende zijn om de moeder te ontlasten van stuwning. Dit heeft tot gevolg dat het moederdier geen proefdier is zoals bedoeld in de Wod maar een fokdier.

Opmerking 3:

“Uit het advies van de DEC volgt dat u de rattenpups dood door middel van decapitatie, waarna de kop in stikstof wordt gedompeld. Hoewel decapitatie als dodingsmethode is opgenomen in bijlage IV van de richtlijn, mag dit slechts toegepast worden wanneer is onderbouwd dat andere methoden niet geschikt zijn. Kunt u deze onderbouwing nog toevoegen onder punt L. in de bijlage dierproeven?”

Antwoord 3:

Wij kiezen er voor om de neonatale pups onder anesthesie te doden door middel van decapitatie omdat inerte gassen als N₂ of argon niet voorradig zijn op het proefdiercentrum van het LUMC en CO₂ asfyxie niet toepasbaar is op neonaten wegens hun ongevoeligheid voor hypoxie. Tevens is een overdosis anesthesie bij de neonatale pups niet gewenst omdat dit de kwaliteit van het hartweefsel negatief kan beïnvloeden. De onderbouwing is toegevoegd onder punt L. in de bijlage dierproeven.

Format DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: AVD116002017818
2. Titel van het project: Onderzoek naar de pathofysiologie van ritmestoornissen in kweekmodellen van ratten hartspiercellen voor de ontwikkeling van genetische interventies.
3. Titel van de NTS: Onderzoek naar genetische interventies voor hartritmestoornissen in celkweekmodellen.
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: DEC Leiden
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 11-01-2017
 - aanvraag compleet: 12-01-2017
 - in vergadering besproken: 19-01-2017
 - anderszins behandeld: aanvullende informatie is via e-mail ronde besproken.
 - termijnonderbreking(en) van / tot: 26-01-2017 t/m 31-01-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 31-01-2017
 - advies aan CCD: 17-02-2017
7. De IvD geeft aan dat de aanvrager de aanvraag 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
 - Datum: 26-01-2017
 - De DEC heeft bij de aanvrager aanvullende informatie ingewonnen met betrekking tot de titel, de euthanasie van de rattenpups en de vermindering in verband met het samenwerkingsverband.
 - Datum antwoord: 31-01-2017
Naar aanleiding van deze vragen is het projectvoorstel inclusief bijlage en de NTS door de aanvrager aangepast.
10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)
 - N.v.t.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over deze projectaanvraag te adviseren. De benodigde expertise op dit wetenschappelijke terrein is aanwezig binnen de DEC.
4. Geen van de DEC leden is betrokken bij het betreffende project.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en een helder geformuleerd resultaat en kan getypeerd worden als een project. De voorgestelde dierexperimenten zijn, naar inziens van de DEC, logisch en nodig om het beoogde concrete resultaat te bereiken. Alle stappen in het project zijn voldoende uitgewerkt en bevatten geen onzekerheden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC kan beoordelen is er geen sprake van 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 dit project is onderzoeken hoe de veranderingen in elektrische eigenschappen van hartspiercellen (zowel atriale als ventriculaire), als gevolg van hypertrofie, fibrosis of oxidatieve stress, door middel van genetische interventies dusdanig kunnen worden aangepast zodat hiermee een positief effect (d.w.z. beëindigen/voorkomen) op hartritmestoornissen kan worden bewerkstelligd. Met als uiteindelijke doel meer wetenschappelijk inzicht verkrijgen in de pathogenese van hartritmestoornissen en in de potentie van genetische interventie als causale behandeling.

De DEC is van mening dat er een duidelijke relatie is tussen het directe en uiteindelijk doel. De aanvrager heeft helder gemaakt wat de status is van het onderzoeksveld en dat de bijdrage van dit project aan het onderzoeksveld zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat ondanks dat er door onderzoek meer bekend is over het ontstaan en de mechanismen achter hartritmestoornissen, deze kennis nog verre van volledig is. Mede door de tekortkomingen aan inzicht is de huidige behandeling van hartritmestoornissen relatief aspecifiek en beperkt, daar het alleen symptomen bestrijdt. Door de zeer specifieke benadering van gentherapie neemt de effectiviteit van de behandeling wellicht toe, terwijl met deze therapie het risico op bijwerkingen en complicaties significant zou kunnen afnemen. Door mogelijk herstel van de normale werking van de hartspiercel, biedt gentherapie zelfs kans op genezing.

De DEC is van mening dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit project dat gericht is op de ontdekking van nieuwe aangrijpingspunten van hartritmestoornissen *in vitro* en de ontwikkeling van gerichte genetische interventies die de ritmestoornis tegengaat, zijn de proefdieren, de onderzoekers, de patiënt en de samenleving.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal

worden aangetast. De rattenpups zullen gedood worden voor het verkrijgen van weefsel.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: De onderzoekers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties.

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De gezondheid van patiënten en hun lichamelijke conditie zal verbeterd worden. Daar genterapie kans biedt op genezing zal succesvolle toepassing van deze vorm van therapie een significante bijdrage leveren aan de mortaliteit en kwaliteit van leven van patiënten met hartritmestoornissen.

Waarden die voor de samenleving bevorderd worden: Nieuwe behandelingsmogelijkheden die hartritmestoornissen in de kern aanpakken kunnen wereldwijd een grote positieve impact hebben op de maatschappij door het afnemen van de mortaliteit- & morbiditeitgraad en enorme ziektekosten.

6. Er worden in de aanvraag geen nadelige effecten op het milieu beschreven. Er is geen aanleiding voor de DEC om dit in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie binnen de gevraagde termijn te realiseren. De onderzoeksgroep heeft ruime ervaring met zowel het gebruik van cellen uit het neonatale ratten hart als de gen therapeutische technieken en read-out systemen beschreven in dit projectvoorstel. In de afgelopen jaren zijn volgens vergelijkbare strategieën en aanpak belangrijke wetenschappelijk resultaten behaald resulterend in een groot aantal publicaties in gerenommeerde wetenschappelijke tijdschriften, proefschriften en subsidies.
8. De DEC is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstelling en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de looptijd van het project.

Welzijn dieren

9. Alle dieren worden gefokt bij een geregistreerd fokbedrijf voor het gebruik in dierproeven, er is geen sprake van afwijkende huisvesting en/of hergebruik. Er is geen sprake van bedreigde diersoorten, niet-menselijke primaten, zwerfdieren en/of dieren uit het wild. De toegepaste methoden voor anesthesie en euthanasie zijn conform de Richtlijn.
10. De DEC is ervan overtuigd dat de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Het proefdiercentrum van het LUMC beschikt over uitstekende faciliteiten en uitsluitend bevoegd en competent personeel zal zorg dragen voor de verzorging van de dieren en de uitvoering van de dierproeven.
11. De DEC heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke heeft gedaan om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. De rattenpups worden, zonder voorafgaande handelingen, onder anesthesie gedood. Dit wordt als geclassificeerd als "terminaal". De inschatting van de DEC is in overeenstemming met het niveau van ongerief geschat door de onderzoekers.

12. De integriteit van de dieren zal worden aangetast. Gedurende het project worden de rattenpups gedood voor het verkrijgen van weefsel.
13. Gezien de rattenpups zonder voorafgaande handelingen gedood worden, wordt niet verwacht dat zich omstandigheden voor zullen doen waarbij het toepassen van humane eindpunten nodig is om verder lijden van de dieren te voorkomen.

3V's

14. In het project wordt de keuze voor de diermodellen duidelijk onderbouwd. De betrokken dieren en het gekozen diermodel zijn het meest geschikt voor deze studieopzet. De desbetreffende dierproef berokkent de dieren het minste pijn, lijden, angst of blijvende schade. Zo wordt er gebruik gemaakt van *in silico* modellen om resultaten voor de *in vitro* en *in vivo* experimenten te voorspellen, waarmee proefdieren worden vervangen. De DEC is ervan overtuigd dat er geen alternatieven beschikbaar zijn voor het voorgestelde gebruik van dieren om de doelstelling van dit project te realiseren.
15. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereisten van vermindering van dierproeven. De onderzoeksgroep heeft jarenlange ervaring met dit soort experimenten. Bovendien beschikt de onderzoeksgroep over een team van biotechnici die de benodigde ervaring hebben met proefdieronderzoek. Zowel de boezems als kamers worden gebruikt en ook de fibroblasten worden in kweek gehouden voor onderzoek. Ook eventuele referentieorganen voor eiwit- of genexpressie analyse wordt uit dezelfde neonatale ratjes gehaald. De DEC is ervan overtuigd dat het onderzoek ethisch verantwoord zal worden uitgevoerd. De DEC acht het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch geschat.
16. De uitvoering van het project is in overeenstemming met de vereisten van verfijning van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven met zo min mogelijk ongerief worden uitgevoerd. Bij de opzet van dit onderzoek wordt rekening gehouden met dierenwelzijn door de rattenpups onder anesthesie worden gedood middels decapitatie, waarna de kopjes direct in de vloeibare stikstof worden geplaatst. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven dierproeven zo humaan mogelijk zullen worden uitgevoerd.
17. Het betreft hier geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Voor de experimenten wordt gebruik gemaakt van zowel mannelijke als vrouwelijke rattenpups.
19. De rattenpups worden gedood in kader van het project. Na het doden van de dieren worden de hartjes uitgenomen om hier vervolgens hartspiercellen uit te isoleren voor *in vitro* onderzoek. Er wordt een voor neonatale rattenpups passende dodingsmethode gebruikt die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden voor dit projectvoorstel geen niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren gebruikt.

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. Rechtvaardigt het onderzoek naar veranderingen in elektrische eigenschappen van hartspiercellen welke door middel van genetische interventies dusdanig kunnen worden aangepast dat hiermee een positief effect op hartritmestoornissen kan worden bewerkstelligd, met als uiteindelijke doel meer wetenschappelijk inzicht verkrijgen in hartritmestoornissen maar tevens ook in de behandeling daarvan, het ongerief dat de dieren wordt aangedaan?
2. Project gericht op de ontdekking van nieuwe aangrijpingspunten van hartritmestoornissen *in vitro* en de ontwikkeling van gerichte genetische interventies die de ritmestoornis tegengaat.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: gering nadeel.
Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: gering voordeel.
Waarden die voor de doelgroep (incl. de maatschappij) bevorderd worden: groot voordeel.
De DEC is van mening dat de belangen van de samenleving in het algemeen en de patiënten in het bijzonder in dit project zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Verschillende pathofysiologische veranderingen aan het hart kunnen leiden tot (dodelijke) hartritmestoornissen. Deze hartritmestoornissen zijn een groot en groeiend, wereldwijd probleem op zowel klinisch, wetenschappelijk als economisch vlak. Ondanks dat er door onderzoek meer bekend is over het ontstaan en de mechanismen achter hartritmestoornissen is de kennis nog verre van volledig. Mede door de tekortkomingen aan inzicht is de huidige behandeling van hartritmestoornissen relatief aspecifiek en beperkt. Tevens hebben patiënten met hartritmestoornissen veelal levenslange medicamenteuze behandelingen nodig, met als enig alternatief bijzonder kostbare medische interventies. Gezien het suboptimale karakter van de huidige therapieën acht de DEC het van essentieel belang dat er meer specifieke en effectieve behandelingen voor hartritmestoornissen ontwikkeld worden. Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Hiertoe zullen dieren worden gebruikt. De onderzoekers doen er echter alles aan om het lijden van de dieren te beperken, waardoor het ongerief van de dieren zo veel mogelijk beperkt blijft.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstelling van dit project. De DEC is van mening dat de waarden die voor de doelgroep bevorderd kunnen worden zwaarder wegen dan de waarden die voor de proefdieren in het geding zijn. Het project is goed opgezet. De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de onderzoeksgroep voldoende ervaring heeft met de gekozen onderzoeksstrategie en met de voorgestelde dierproeven om de doelstelling te behalen en dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De DEC onderschrijft dat de doelstelling niet zonder het gebruik van proefdieren behaald kunnen worden en acht het gebruik van het aantal dieren en het daarmee samenhangende ongerief (terminaal) bij de dieren 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

17 februari 2017

- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
 - Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
 - Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...
 - De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
 - De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
 - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
 - De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn tijdens de beoordeling van dit projectvoorstel geen echte knelpunten en of duidelijke dilemma's naar voren gekomen.

Van: Info-zbo
Verzonden: vrijdag 10 maart 2017 16:24
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: status van AVD116002017818

Geachte,

De aanvraag AVD116002017818 is besproken door de CCD en er is besloten deze aanvraag te vergunnen. Omdat de leges nog niet ontvangen zijn kan de aanvraag niet verder afgerond worden. Zodra de leges ontvangen zijn sturen wij de beschikking aan u toe en kunt u aanvangen met de uitvoer van uw project, tot die tijd is de behandelingsperiode 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!)

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 27 februari 2017 15:47
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: vragen bij de behandeling van AVD116002017818

Geachte dr. [REDACTED],

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend waar bij de behandeling nog een paar vragen zijn. Het betreft uw project AVD116002017818: Onderzoek naar de pathofysiologie van ritmestoornissen in kweekmodellen van ratten hartspiercellen voor de ontwikkeling van genetische interventies.

U beschrijft het ongerief als terminaal, dit is niet correct. Wanneer de dieren eerst gedood worden en pas daarna de organen, in dit geval het hart, verwijderd worden wordt dit gezien als licht ongerief. Kunt u dit in de bijlage dierproeven en de Niet Technische Samenvatting aanpassen?

U beschrijft in de bijlage dierproeven onder K. dat de moeders licht ongerief ondervinden, wanneer dit het geval is, dan zijn de moederdieren onderdeel van dit projectvoorstel en moet u het aantal dieren opnemen onder B. Kunt u in overleg met de IvD vaststellen of de moederdieren drempel overschrijdend ongerief zullen ondervinden?

Uit het advies van de DEC volgt dat u de rattenpups dood door middel van decapitatie, waarna de kop in stikstof wordt gedompeld. Hoewel decapitatie als dodingsmethode is opgenomen in bijlage IV van de richtlijn, mag dit slechts toegepast worden wanneer is onderbouwd dat andere methoden niet geschikt zijn. Kunt u deze onderbouwing nog toevoegen onder punt L. in de bijlage dierproeven?

Kunt u in de NTS onder 3.6 de zin 'de dieren zullen overlijden onder narcose' herformuleren naar 'de dieren worden gedood onder narcose'?

Uw aanvraag zal in de vergadering van 10 maart door de CCD besproken worden, kunt u uiterlijk 9 maart de aanvullingen aan ons toesturen? De behandelingsperiode van uw aanvraag is gestopt totdat de aanvullingen ontvangen zijn.

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!)



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Ziekenhuis Leiden
Leids Universitair Medisch Centrum
t.a.v. drs. [REDACTED]
Postbus 9600
2300 RC LEIDEN


**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
AVD116002017818
Bijlagen
1

Datum 21 maart 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte drs. [REDACTED]

Op 21 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek naar de pathofysiologie van ritmestoornissen in kweekmodellen van ratten hartspiercellen voor de ontwikkeling van genetische interventies" met aanvraagnummer AVD116002017818. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 9 maart 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Er zijn u vragen gesteld over de classificatie van het ongerief, de onderbouwing van de gekozen dodingsmethode en de formulering van de NTS. U heeft de vragen beantwoord en de documenten aangepast en opnieuw ingediend.

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, is er een algemene voorwaarde gesteld. Zoals u zelf beschrijft onder het punt Vervanging in de bijlage dierproeven, is het gezien de ontwikkelingen in dit onderzoeksveld, niet ondenkbaar dat het binnen de looptijd van 5 jaar mogelijk is om de doelstellingen van dit project zonder proefdieren te behalen. Wij verzoeken u samen met de IvD deze mogelijkheden te blijven onderzoeken.

U kunt met uw project "Onderzoek naar de pathofysiologie van ritmestoornissen in kweekmodellen van ratten hartspiercellen voor de ontwikkeling van genetische interventies" starten. De vergunning wordt afgegeven van 22 maart 2017 tot en met 28 februari 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Datum:
21 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002017818

Procedure

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

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

Datum:
21 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD116002017818



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Academisch Ziekenhuis Leiden

Adres: Postbus 9600

Postcode en plaats: 2300 RC LEIDEN

Deelnemersnummer: 11600

deze projectvergunning voor het tijdvak 22 maart 2017 tot en met 28 februari 2021, voor het project "Onderzoek naar de pathofysiologie van ritmestoornissen in kweekmodellen van ratten hartspiercellen voor de ontwikkeling van genetische interventies." met aanvraagnummer AVD116002017818, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Leiden. 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 21 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 9 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 9 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 februari 2017, ontvangen op 21 februari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 9 maart 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Excisie van neonatale ratten harten				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / rattenpups 2 dagen oud	5.760	100% Licht	

Voorwaarden

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

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

Aanvraagnummer:
AVD116002017818

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:

AVD116002017818

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:
AVD116002017818

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 W17-08										
nr.	document NTS 2017829	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x	x	x	x		
4	Bijlage 1				x	x	x	x		
5	Bijlage 2				x	x	x	x		
6	Bijlage 3				x	x	x	x		
7	Ontvangstbevestiging en factuur				x		x	x		
8	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
9	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x	x	x	x		
10	DEC advies				x	x	x	x		
11	Advies CCD		x							x
12	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 10700 <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 Maastricht Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [REDACTED] KvK-nummer 50169181 Straat en huisnummer Minderbroedersberg 4-6 Postbus 616 Postcode en plaats 6200 MD Maastricht IBAN NL04 INGB 0679 5101 68 Tenaamstelling van het rekeningnummer Universiteit Maastricht
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>	(Titel) Naam en voorletters [REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. Functie [REDACTED] Afdeling [REDACTED] Telefoonnummer [REDACTED] E-mailadres [REDACTED]
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters [REDACTED] <input 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 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?
- 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?
- Evaluation of a drug-loaded ocular coil for sustained drug delivery to the eye
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Evaluatie van een oculaire coil voor gereguleerde geneesmiddelenafgifte aan het oog
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---------------------------------|
| Naam DEC | DEC-UM |
| Postadres | Postbus 616, 6200 MD Maastricht |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

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

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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

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

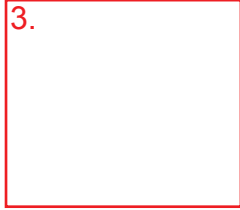
Naam 

Functie 

Plaats Maastricht 

Datum 19 - 1 - 2017

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

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.

Background

In the treatment and prevention of ocular diseases, eye drops, ointments, inserts and implants are often the first line of defence. Ocular conditions that warrant appropriate ophthalmic drug therapy include contact lens induced microbial keratitis (MK), cataract surgery, dry eye disease, glaucoma, uveitis, age related macular degeneration (AMD) and diabetic retinopathy (DRP).

Motivation

Topical administration of drugs via eye drops is the most common drug delivery route for ocular disease. Despite the ease of access of eye drops and the readily achieved therapeutic concentrations in anterior segment tissues, they also have some significant disadvantages. A short duration of action, high peak drug concentrations and considerable systemic absorption of the drug are several important shortcomings. For example, the absolute [REDACTED] [REDACTED]

In order to maintain minimal effective concentrations, drugs need to be dosed frequently. However, it is known that patient compliance (the degree to which a patient correctly follows medical advice) is poor. Low patient compliance is caused by forgetfulness or life stress by the patient, a low self-efficacy of self administration, difficulties with the medication schedule and side effects. Moreover, incorrect instilling of the eye drop is also encountered as a severe problem, probably in more cases than assumed by the patients themselves. These obstacles can result into complications, which are a significant burden for the health care system. Besides, it is often unclear whether the patient is not compliant or whether the drug is not working. (Eaton, 2015; Mohindroo, 2015)

To improve drug delivery and bypass patient compliance issues, injections (subconjunctival, subtenon, intracameral, intravitreal) into the targeted site are used. However, the optimal concentrations are difficult to calculate and are invasive for the patient. For example, intravitreal injections for AMD need to be repeated at monthly intervals with poor patient tolerance (pain and fear), significant risks (e.g. endophthalmitis), and high costs (e.g. loss of working hours). Therefore, new methods for ocular drug delivery and drug detection are essential within the ophthalmic field.

To improve drug delivery, our group invented an ocular coil which can be placed in the lower conjunctival fornix of the eye for slow and constant drug release over a longer period of time (28 days). This ocular coil removes the burden of daily eye drop administration, hereby improving patient compliance. The ocular coil is not invasive, and can easily be removed (without surgical intervention) when the treatment is finished.

In the detection of ocular drug levels, we face the problem that this can only be detected by taken an aqueous humor sample (which is an invasive procedure) and analyzing this sample by [REDACTED]

Therefore, we suggest a new method, namely: [REDACTED]. This has the advantage to detect [REDACTED]

[REDACTED] With this technique, drug concentrations can be quantified *in vivo*, although not much work has been done in this field.

Our group has been developing and optimizing this technique for years. [REDACTED] measured *in vivo* silicone oil in the cornea of living rabbits. [REDACTED] used *in vivo* [REDACTED] to measure drugs in the cornea of human eyes. In [REDACTED], published the [REDACTED] pattern of several ocular drugs, for example [REDACTED]).

Therefore, we would also like to explore whether [REDACTED] can be a valuable and non-invasive alternative to [REDACTED] for quantifying drug levels in the eye. When successful, this technique will be implemented in the second study (ocular pharmacokinetics study) and could replace the invasive [REDACTED] method.

Context

Because of their assumed advantages such as increased local bioavailability, slow and constant drug release, reduction of systemic absorption and improved patient compliance, amongst others, the development of non-invasive ocular fornix devices has gained popularity for the treatment of anterior segment disease in the last decade. Together with our collaborators, we designed an ocular coil loaded with a drug. This coil will be placed in the lower conjunctival fornix where it can gradually release the loaded drug to the tear film (Figure 1).

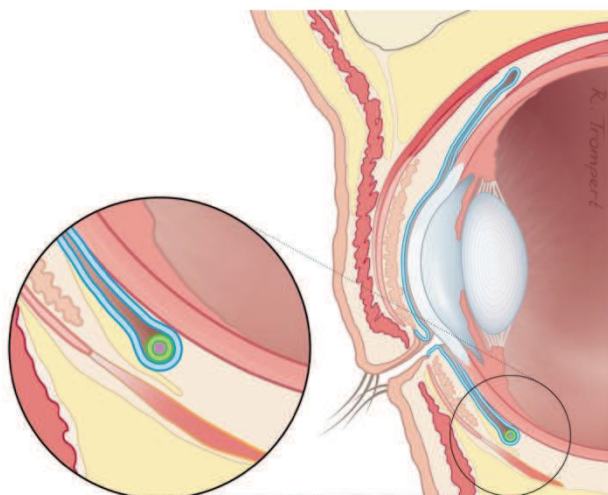


Figure 1. Sagittal section of an ocular coil for sustained drug delivery, placed in the lower conjunctival fornix of a patient.

Preliminary results

In the early 2000's, we designed a drug-loaded adherent hydrogel on a thin metallic wire, which is coiled ([REDACTED]). The coiled structure accounts for the device's flexibility and integrity. The hydrogel coating starts to swell once the device contacts the tear fluid, and concomitant release of the drug into the tear film occurs. The so-called [REDACTED] design was 16mm (including caps) in length and consisted of a 76 microns metal wire diameter wound around a mandrel of 432 microns (total thickness 584 microns) (Figure 2).

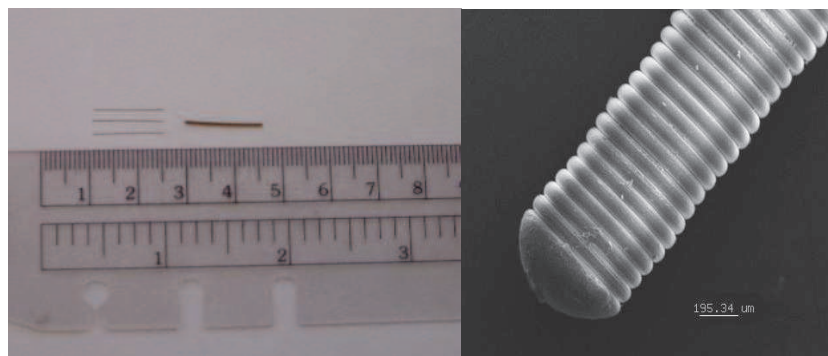


Figure 2. Illustration of the [REDACTED] including dimensions and the drug loaded fillaments which can be placed in the lumen of the ocular coil and end-capping ([REDACTED]).

In vitro studies on the successful drug release from the ocular coil have been reported for the dye fluorescein and the antibiotics chloramphenicol and pradofloxacin ([REDACTED]). The sustained release of the latter drug was also evaluated *in vivo*. Drug levels in the tear fluid of dogs after insertion of the ocular coil remained within the aimed concentration range during the entire 72 hours ([REDACTED]). The tolerance of the ocular coil was also evaluated in a preliminary *in vivo* study in five human subjects for a 2 hour period. Volunteers reported that the presence of the device in the eye could be noticed, but no irritation was reported ([REDACTED]).

Follow-up

After these studies, no further research was initiated since the patent holder made a strategically decision to move its R&D investments towards ocular drug delivery to the posterior segment of the eye. However, recent decision to invest in this technology has led to a new research project that will focus on the optimization of the tolerability of the device in the *in vivo* human clinical setting and on the drug release kinetics *in vitro* and *in vivo*.

Several parameters (such as the coil diameter, wire diameter, flexibility, coating and drug loading) will be modified to enhance the tolerability and drug release kinetics of the new coil. Hereafter, a preclinical ocular pharmacokinetic study (using drug-loaded coils) in rabbits and a human comfort trial (using non-loaded coils) will be initiated.

[Redacted text block]

After successful completion of the studies, human clinical trials will be performed to evaluate the advantages of the coils in term of effectiveness, safety and comfort as compared to conventional ocular drug delivery systems.

References

[Redacted references list]

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 project is to develop a novel drug delivery system (the ocular coil) in order to enhance the drug release profile and prolonged contact time as compared to eye drops.

Within the project, this animal study addresses three research questions:

1. [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
2. How much drug does the ocular coil deliver to the eye? The drug release, the pattern and kinetics of an ocular coil will be compared to eye drops. In addition, the kinetics of drug release will be examined. This research question will be addressed in the 'ocular pharmacokinetics study'. In this study, multiple coils will be tested so that the most optimal filled ocular coil will be used during the third study.
3. Is the drug-loaded ocular coil effective in treating inflammation? And is it more effective than eye drops? This will be investigated in the 'ocular efficacy study'.

The chance of succes of this project is considered high. Preliminary results from a (small cohort) preclinical study in dogs and a human comfort trial, show that an ocular coil is well tolerated for a short period of time (24 hours in dogs) and for 2 hours in humans. In this study we expand the time period to 28 days (which equals the total period of drug treatment after cataract surgery).

Since 2006, several improvements have been made to the design of the coil, making it even more flexible (Figure 3.2.1) and with better drug-releasing properties. Furthermore, the investigators of this project are currently improving their knowledge and skills, e.g. practicing [REDACTED] and optimizing protocols using rabbit eyes from other experiments, to increase the achievability of this project.

and the importance of the diseases where this unmet need is relevant is outlined here.

In 2011, cataract surgery with implantation of an intraocular lens (IOL) was performed around 3 M times in western Europe. It is estimated that by 2020, globally 32 M cataract operations will be performed (vs. 12 M in 2000). Complications of cataract surgery which lead to vision loss are infection (0.1%), macular edema (5-20%), and posterior capsule opacification (up to 20%).

Uveitis (inflammation of the part of the eye called the uvea) is the fifth most common cause of vision loss in the developed world accounting up to 24% of legal blindness. The incidence of the disease is 52.4/100.000 in the developed world, up to three or four times higher in the third world. The highest incidence of the disease is in the working age population, but all age groups can be affected. Up to 30% of uveitis is associated with a systemic disease. Complications of uveitis include macular oedema, scarring of the retina, cataract and glaucoma. Treatment of uveitis focuses on reducing inflammation and relieving pain via eye drops or ointments eye drops, which could be replaced by the coil.

The coil serves as proof-of-concept. Further studies can be performed for other diseases, using other types of drugs (such as pressure-lowering drugs, anti-angionetic drugs or antibiotics) thereby increasing its relevance and market potential.

Glaucoma is the leading cause of preventable blindness. The prevalence of glaucoma in Europe is 2% and in 2010 there were over 12 M glaucoma patients, of whom 1.7 M became blind. The number of glaucoma patients will increase to 14 M in 2020. Currently, in the US, eye drops are often the first choice for treating patients. Glaucoma eyedrops can significantly reduce the risk that high eye pressure will progress to glaucoma, only if taken on a regular and consistent basis. An ocular coil loaded with pressure-lowering drugs may improve the outcome of many patients, since compliance towards the drugs is guaranteed.

The incidence in Europe for age related macular degeneration (AMD) is estimated to be 1.2 M and for diabetic retinopathy (DRP) 1.5 M (prevalence 9 M and 15 M, respectively). The prevalence of AMD is expected to rise to 10.7 M in 2016. In both diseases, the macula or retina is damaged leading to vision loss and blindness. Treatment includes frequent injections of anti-angiogenic drugs in the eye and around the eye in order to reduce abnormal blood vessel growth. The risks associated with intraocular injections are pain, bleeding, cataract, infections and damage to the eye. An ocular coil (loaded with anti-angiogenic drugs) may overcome these risks and, as such, improve the current therapies.

Around 50% of the European population suffers from refractive errors which is treated by (soft) contact lens (SCL) wear in 4 to 14% of the European population. Contact lens wearers may develop microbial keratitis (MK). The incidence of SCL-related MK varies from 4 to 25 per 10.000 wearers. Bacterial

keratitis is usually treated with antibiotic eye drops. If bacterial keratitis is caught and treated early, vision may be preserved. However in severe cases, or if the infection affects the center of the cornea, decreased vision or blindness may result. An ocular coil (loaded with antibiotics) could be used as a treatment for keratitis.

To conclude, a drug-loaded ocular coil can have a huge positive impact on the way drugs are delivered to the eye in multiple diseases thanks to higher patient compliance and better drug absorption.

Besides the ocular coil, also the optimization of [REDACTED] could have a large impact in the field. Since it is difficult for ophthalmologists to draw a conclusion about the efficacy of drugs and patient compliance, it would be a huge advantage when quantities of drugs can be localized and an ophthalmologist can say whether the patient is compliant to his or her therapy or whether the drug works or not. With [REDACTED] this seems possible, although not much research has been conducted in this field.

3.4 Research strategy

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

Overall design of the research project

This research project aims at developing a new medical device. It includes the whole developmental cascade, going from manufacturing to *in vitro*, preclinical (*in vivo*) and finally to clinical (human) trials.

- I. Design and manufacturing of drug-loaded ocular coils
- II. *In vitro* tests to examine the coil's physical properties and drug release pattern.
- III. *In vivo* animal study to evaluate the ocular pharmacokinetics of a drug-loaded ocular coil and make the most optimal coil for drug delivery.
- IV. *In vivo* animal study to evaluate the therapeutic efficacy of the drug-loaded ocular coil in an inflammation model.
- V. Human trial to assess the safety and tolerability of the ocular coil in healthy volunteers.
- VI. Human trial to investigate the efficacy of the ocular coil in patients.

The current proposal covers the two *in vivo* animal studies (III and IV). In addition to these two studies, we want to evaluate the feasibility of a new drug-detection technique ([REDACTED]) which has been developed by our group. This proof-of-concept study may offer the possibility to perform animal studies in a more non-invasive way.

Animals

All animal studies will be done in rabbits. The rabbit's eye is ideally suited for ophthalmic research for several reasons. Because the rabbit eye is relatively large, it has proved useful for the assessment of both new technologies as well as ophthalmic surgical procedures (Gwon 2008). The ocular anatomy of the rabbit (such as the cornea, aqueous humor composition and musculature) is very similar to that in human, when compared to other rodents. (Gwon 2008, Thakur 2011).

Table 3.4.1 Ocular sizes of human, rat and rabbit.

	Axial Length (mm)	Corneal Thickness (mm)	Anterior Chamber Depth (mm)	Lens Thickness (mm)	Vitreous Chamber Depth (mm)	References
HUMAN	23.92	0.55	3.05	4.0	16.32	A Photon Accurate Model of the Human Eye, Deering, ACM Transactions on Graphics, 2005
RABBIT	18.1	0.4	2.9	7.9	6.2	A Schematic Eye for the Rabbit, HUGHES, Vision Research, 1972
RAT	5.98	0.25	0.87	3.87	1.51	A Revision of the Rat Schematic Eye, MASSOF and CHANG, Vision Research, 1972

██████ proof-of-concept study

One group of animals will be used for the ██████ proof-of-concept study (Table 1). Animals will receive ██████ eye drops in one of their eyes for four weeks. Both eyes will be investigated with the ██████. After each ██████ measurement, aqueous humor of the treated eyes will be sampled and analysed by ██████ in order to correlate the results of the ██████ measurement to the ██████ results. In addition, the safety of the ██████ technique will be evaluated in the untreated eyes by ophthalmic examinations. In the end, the rabbits will be sacrificed and the eyes will be enucleated and further investigated *ex vivo*.

Study	Animal group	Intervention
██████ proof-of-concept study	1	██████ eye drops (treated eyes) Saline eye drops (untreated eyes)

Table 1. Overview of different animal groups in the ██████ proof-of-concept study.

Ocular pharmacokinetics study

Two groups of animals will provide us information about the pharmacokinetics of an ocular coil compared to the current golden standard, ██████ containing eye drops. One of the groups will receive eye drops, while the other group will receive an ocular coil (Table 2). Blood samples will be drawn, and ophthalmic investigations (such as slit lamp and tear fluid sampling) will be done regularly. When the ██████ proof-of-concept study confirms the ease of use of *in vivo* ██████, this will be used for the detection of ██████ levels in the aqueous humor (AH). When this is not possible, AH samples will be taken regularly for the analysis of the pharmacokinetics in the eye.

When the drug concentrations in the AH samples are significantly lower than those in the eye drop group, the drug matrix in the ocular coil will be re-evaluated and a new group of rabbits will receive the ocular coil. The data from the control group will be re-used to compare to the new group. Because of this, the same experiment is not done twice.

Study	Animal group	Intervention
Ocular	2	██████-loaded coil

pharmacokinetics study	3	██████████ eye drops
------------------------	---	----------------------

Table 2. Overview of different animal groups in the ocular pharmacokinetic study.

Ocular efficacy study

Within this study an inflammation response will be induced in one of the eyes of the rabbits in group 4, 5 and 6. Afterwards, the eye will be treated with a ██████████ loaded ocular coil (group 4), ██████████ eye drops (group 5) or will remain untreated (group 6) (Table 3). Inflammation bio-markers (e.g. cytokines, immunoglobulins and proteins) will be measured in the tears, blood and aqueous humor. Ophthalmic examinations will be performed to grade inflammation. After four weeks the rabbits will be sacrificed and the ocular tissue will be used *ex vivo* to investigate the morphology.

Study	Animal group	Intervention
Ocular efficacy study	4	██████████-loaded coil
	5	██████████ eye drops
	6	Untreated control

Table 3. Overview of different animal groups in the ocular efficacy study.

Regulatory requirements

Concerning future drug approvals, animal experiments are required to demonstrate its pharmacokinetics and efficacy *in vivo*.

References

- Gwon, A. (2008) The rabbit in cataract/IOL surgery. In: Tsonis, P.A. (ed.) Animal models in eye research. Elsevier, pp. 184-204.
- Thakur RR and Kashiv M, Modern Delivery Systems for Ocular Drug Formulations: A comparative Overview W.R.T Conventional Dosage Form, IJPBR 2011, 2 (1) 8-18.

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.

██████████ proof-of-concept study

This study will provide insight whether ██████████ can be used to quantitatively detect ██████████ *in vivo*. The results from ██████████ will be correlated to ██████████ analysed aqueous humor samples. In addition, the safety of the ██████████ technique will be examined *in vivo* and *ex vivo* in a period of four weeks.

██████████ proof-of-concept study	Animal group 1 (treated eye)	Animal group 1 (untreated eye)
Insertion of ██████████ eye drops	X	
██████████	X	X
Aqueous humor sampling	X	

Cell sampling	X	X
Ophthalmic examinations	X	X
Sacrifice for <i>ex vivo</i> analysis	X	X

Table 4. Outline of the methods used in the [REDACTED] proof-of-concept study

Ocular pharmacokinetics study

The pharmacokinetic profile of a drug-loaded ocular coil will be examined for four weeks (Table 4). The coil will be inserted in the lower conjunctival fornix. Tear fluid will be sampled to measure the local concentration of [REDACTED]. Aqueous humor and blood will be sampled to determine the systemic and local concentration of [REDACTED]. The use of [REDACTED] to determine the level of [REDACTED] *in vivo* will depend on the preceding [REDACTED] proof-of-concept study. Whenever [REDACTED] is not feasible, aqueous humor samples will be taken and analysed by [REDACTED]. After four weeks, the animals will be sacrificed and the concentration of [REDACTED] in the different layers of the eyes will be further investigated *ex vivo*. When the drug concentrations in the eye are significantly lower in the ocular coil group compared to the eye drop group, the design of the drug matrix from the ocular coil will be re-evaluated and this study will be repeated with only one group and a new ocular coil. These animals will then be compared to the eye drop group (group 3).

Ocular pharmacokinetics study	Animal group 2	Animal group 3
Placement of [REDACTED]-loaded coil	X	
Installation of [REDACTED] eye drops		X
Tear fluid sampling	X	X
Blood sampling	X	X
[REDACTED]	X	X
Sacrifice for <i>ex vivo</i> analysis	X	X

Table 5. Outline of the methods used in the ocular pharmacokinetics study.

Ocular efficacy study

An immune response will be induced by a puncture in the cornea of the eyes of animal groups 4, 5 and 6 under anesthesia (also topical anesthetics will be applied during this procedure). Afterwards, a [REDACTED] loaded ocular coil will be placed in the conjunctival fornix in group 4. Group 5 will receive [REDACTED] eye drops while group 6 will be untreated (Table 6). All rabbits will be examined by ophthalmic examinations (e.g. slit lamp examination, tonoscopy, OCT). Inflammation biomarkers will be investigated in tear, aqueous humor and blood samples and by *ex vivo* histologic analysis.

Ocular efficacy study	Animal group 4	Animal group 5	Animal group 6
Induction of inflammation	X	X	X
Placement of [REDACTED]-loaded coil	X		
Installation of [REDACTED] eye drops		X	
Tear fluid sampling	X	X	X

Aqueous humor sampling	X	X	X
Blood sampling	X	X	X
Cell sampling	X	X	X
Ophthalmic examinations	X	X	X
Sacrifice for <i>ex vivo</i> analysis	X	X	X

Table 6. Outline of the methods used in the ocular efficacy study.

Methods

Placement of [REDACTED] coil

The ocular coil will be inserted in the lower conjunctival fornix on day 0. When loss of the coil is observed, the ocular coil will gently be stitched onto the conjunctiva under sedation.

Installation of [REDACTED] eye drops

The eye drop will be instilled in the conjunctival sac three times a day.

Induction of inflammation

Since rabbits develop a strong immune response towards ocular damage, a small incision (or puncture) in the ocular tissue can lead to a reaction similar to that in humans after anterior chamber surgery (Bito, 1984). Therefore, we will puncture the cornea to induce an immune response. This can unfortunately not be done in a less severe method.

Fluids and cell sampling

Samples of blood will be taken to investigate the presence of inflammatory markers (ocular efficacy study, animal groups 4, 5 and 6). Epithelial cells will be sampled to examine epithelial damage ([REDACTED] study, animal group 1). Samples of the tears, aqueous humor and blood will be withdrawn and analysed for its ketorolac content ([REDACTED] study and ocular pharmacokinetics study, all groups).

The following samples will be taken of the rabbits, while they are alive:

- Blood
- Epithelial cells
- Tear fluid
- Aqueous humor

[REDACTED]
The drug concentration level of [REDACTED] will be measured by [REDACTED], a technique based on the detection of [REDACTED]. [REDACTED] is non-invasive but will be performed under general anesthesia in order to avoid movement of the eye, discomfort and stress to the animal and to allow precise evaluation.

Ophthalmic examinations

Inflammation (ocular efficacy study) will be assessed by several ophthalmic examinations (for example slit-lamp microscopy, tonometry and optical coherence tomography) (animal groups 4, 5 and 6). All ophthalmic examinations are non-invasive but will be performed under general anesthesia in order to avoid movement of the eye, discomfort and stress to the animal and to allow precise evaluation.

- With the aid of slit-lamp microscopy, the ocular status can be determined. Slit-lamp findings may be graded based on the methods of McDonald and Shadduck (Gwon 2008, McDonald and Shadduck 1977).
- Tonometry is the measurement of the intraocular pressure (IOP). A tonometer can measure the counter pressure when the probe gently touches the cornea. Intraocular inflammation is the most common cause of ocular hypotension.
- Optical coherence tomography (OCT) is a medical imaging technique to take cross-section pictures of the eye. OCT can be used to detect inflammation, irritation or other ocular changes.

Sacrifice for ex vivo analysis

In the end, the rabbits will be euthanized and the eyes will be enucleated for further investigation of [REDACTED] content (ocular pharmacokinetics study) or inflammation (ocular efficacy study).

References

- Bito, L. Z. (1984). "Species differences in the responses of the eye to irritation and trauma: a hypothesis of divergence in ocular defense mechanisms, and the choice of experimental animals for eye research." Exp Eye Res **39**(6): 807-829.
- Cheung, Durrani and Murray, The safety of anterior chamber paracentesis in patients with uveitis, Br J Ophthalmol. 2004 Apr; 88(4): 582-583.
- Van der Lelij A, Rothova A. Diagnostic anterior chamber paracentesis in uveitis: a safe procedure? Br J Ophthalmol 1997;81:976-9.
- Trivedi D, Denniston A and Murray P, Safety profile of anterior chamber paracentesis performed at the slit lamp, Clinical and Experimental Ophthalmology 2011; 39: 725-728
- Belen L, Violette K, Brackett J and Whitlock A, Validation of the Anterior Chamber Paracentesis Model for the Screening of Novel Ophthalmic Anti-Inflammatory Drug, IVOS 2013, Vol.54, 110
- Small D, Hevy J and Tang-Liu D. Comparison of tear sampling techniques for pharmacokinetic analysis: Ofloxacin concentration in rabbit tears after sampling with Schirmer tear strips, capillary tubes, or surgical sponges, J. Ocular Pharmacology and therapeutics, 2000, Vol. 16, (5), 439-446.
- Posa A, Brauer L, Schicht M, Garreis F, Beileke S and Paulsen F. Schirmer strip vs. capillary tube method: Non-invasive methods of obtaining proteins from tear fluid, Annals of Anatomy, Vol.195, (2),137-142
- Diehl K, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J and van de Vorstenbosch C, A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes, J. Appl. Toxicol. 2001, 21, 15-23.

-NC3R guidelines <https://www.nc3rs.org.uk/general-principles>

Singh R, Joseph A, Umapathy T, Tint N and Dua H, Impression cytology of the ocular surface, Br J Ophthalmol 2005;89:1655–1659.

-Dogan A, Astvatsatourov A, Deserno TM, Bock F, Shah-Hosseini K, Michels A and Mösges R, Objectifying the Conjunctival Provocation Test: Photography-Based Rating and Digital Analysis, Int Arch Allergy Immunol 2014;163:59–68.

-Gwon, A. (2008) The rabbit in cataract/IOL surgery. In: Tsonis, P.A. (ed.) Animal models in eye research. Elsevier, pp. 184-204.

-McDonald TO , Shadduck JA (1977). Eye irritation . In: Marzulli , Maibach (eds) , Advances in Modern Toxicology, Volume 4: Dermatotoxicology and Pharmacology . Hemisphere , Washington pp. 162 – 166.

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 three animal studies are in line with each other.

The first study (██████████ proof-of-concept study) will show the feasibility of using ██████████ as non-invasive alternative to measure drug concentrations *in vivo*. When successful, this technique will be implemented in the second study (ocular pharmacokinetics study). If not, aqueous humor sampling will be used instead.

The second study (ocular pharmacokinetics study) will demonstrate the drug release from an ocular coil. If the drug release in the ocular is stable, does not result in ocular toxicity and is not significantly lower than the drug concentration in the eye drop group, the third study (ocular efficacy study) will start to demonstrate the efficacy of the ocular coil in treating inflammation. Ocular drug levels, although lower (but not significantly lower), but given constantly, seem more effective than fluctuating drug levels. (Brandt, (2016))

-Brandt, J.D., et al., When successful, this technique will be implemented in the second study (ocular pharmacokinetics study). J. Ophthalmology, 2016 p.1-10

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	██████████ proof-of-concept study
2	Ocular pharmacokinetics study
3	Ocular efficacy study
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)

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. 10700

1.2 Provide the name of the licenced establishment. Maastricht University

1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	██████ proof-of-concept study

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.

We will perform an *in vivo* proof-of-concept study evaluating whether ██████████ can be used as a non-invasive method to quantify drug concentrations in the anterior chamber of the eye. Simultaneously, we will evaluate the safety of the ████████ technique. The primary outcome of this study is detection of the drug concentration. The secondary outcome of this study is safety of the technique.

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

We will perform an *in vivo* proof-of-concept study evaluating whether ██████████ can be used as a non-invasive method to quantify drug concentrations in the anterior chamber of the eye in a period of four weeks. Simultaneously, we will evaluate the safety of the ████████ technique. ██████████ is a non-invasive technique and the ██████████

to be dangerous for the eye. In addition, [REDACTED] prevent damage to the eye. An outline of the [REDACTED] proof-of-concept study is presented in Table 1 and 2.

Study	Animal group	Intervention
[REDACTED] proof-of-concept study	1	[REDACTED] eye drops (treated eyes) [REDACTED] eye drops (untreated eyes)

Table 1. Overview of different animal groups in the [REDACTED] proof-of-concept study.

The rabbits of animal group 1 will be treated with [REDACTED] eye drops (which are on the market e.g. [REDACTED] in one eye according to the human drug regime as applied in the clinic (3 times a day one drop per eye) for four weeks. After dropping one of the eyes, the treated eye will be measured with [REDACTED] to quantify the drug levels in the anterior chamber. A gel (also used in the clinic for humans to mirror the angle from glaucoma patients) will be applied to cover the surface of the eye for an optimal refractive index, and to protect the corneal surface from possible damage of the [REDACTED]. The measurements will take up to ~10 minutes per eye. After each [REDACTED], a sample of the aqueous humor of the treated eye will be taken and the drug level will be quantified by [REDACTED]. After the first week some of the rabbits will be sacrificed, again after the second, third and fourth week, to investigate drug levels in the ocular tissue.

The untreated eyes of the rabbits of animal group 1 will be used to investigate the safety of the [REDACTED] technique. After each [REDACTED], a sample of the epithelial cells will be taken and the eye will be investigated by ophthalmic examinations.

[REDACTED] proof-of-concept study	Animal group 1 (treated eye)	Animal group 1 (control eye)
Insertion of [REDACTED]	X	
[REDACTED]	X	X
Aqueous humor sampling	X	
Cell sampling	X	X
Ophthalmic examinations	X	X
Sacrifice for <i>ex vivo</i> analysis	X	X

Table 2. Outline of the methods used in the [REDACTED] proof-of-concept study

Installation of eye drops

The eye drop will be instilled in the conjunctival sac. The eye drops will contain [REDACTED]. Instilment of the eye drops can be done without anesthesia by gentle restraining.

Fluids and cell sampling

Epithelial cells will be sampled to examine epithelial damage (████████ safety study, animal group 1, untreated eyes). These measures will be performed under general anesthesia or hypnosis (sedation) in order to avoid movement of the eye, discomfort and stress to the animal and to allow precise evaluation.

- Aqueous humor will be collected by inserting a needle into the anterior chamber. The safety of this sampling technique has been described in the literature (Van der Lelij 1997, Cheung 2004, Trivedi 2011). The aqueous humor will be analyzed in order to calculate the ocular absorption of ██████████
- Epithelial cells from the ocular surface will be collected by impression cytology in a non-invasive way (Singh 2005). Cells will be further subjected to (immune-) cytological analysis.

██████████
The drug concentration level of ██████████ ██████████ proof-of-concept study, animal group 1, treated eyes) will be measured by ██████████, a technique based on the detection of ██████████
██████████ is non-invasive but will be performed under general anesthesia or hypnosis (sedation) in order to avoid movement of the eye, discomfort and stress to the animal and to allow precise evaluation.

Ophthalmic examinations

Inflammation (████████ safety study, animal group 1, untreated eyes) will be assessed by several ophthalmic examinations (for example slit-lamp microscopy, tonometry and optical coherence tomography) (animal group 1, untreated eyes). All ophthalmic examinations are non-invasive but will be performed under general anesthesia or hypnosis (sedation) in order to avoid movement of the eye, discomfort and stress to the animal and to allow precise evaluation.

- With slit-lamp microscopy, the ocular status can be determined. Slit-lamp findings may be graded based on the methods of McDonald and Shaddock (Gwon 2008, McDonald and Shaddock 1977).
- Tonometry is the measurement of the intraocular pressure (IOP). A tonometer can measure the counter pressure when the probe gently touches the cornea. Intraocular inflammation is the most common cause of ocular hypotension.
- Optical coherence tomography (OCT) is a medical imaging technique to take cross-section pictures of the eye. OCT can be used to detect inflammation, irritation or other ocular changes.

Ex vivo examination

In the end, the rabbits will be euthanized and the untreated eyes will be enucleated for further investigation of potential technique-induced inflammation (safety of ██████████ technique).

References

-Cheung, C. M., O. M. Durrani and P. I. Murray (2004). "The safety of anterior chamber paracentesis in

patients with uveitis." Br J Ophthalmol 88(4): 582-583.

-Gwon, A. (2008) The rabbit in cataract/IOL surgery. In: Tsonis, P.A. (ed.) Animal models in eye research. Elsevier, pp. 184-204.

-McDonald, T.O., Shaddock, J.A. Eye irritation. *Adv Mod Toxicol*. 1977;4:139-191.

-Singh, R., A. Joseph, T. Umapathy, N. L. Tint and H. S. Dua (2005). "Impression cytology of the ocular surface." Br J Ophthalmol 89(12): 1655-1659.

-Trivedi, D., A. K. Denniston and P. I. Murray (2011). "Safety profile of anterior chamber paracentesis performed at the slit lamp." Clin Experiment Ophthalmol 39(8): 725-728.

-Van der Lelij, A. and A. Rothova (1997). "Diagnostic anterior chamber paracentesis in uveitis: a safe procedure?" Br J Ophthalmol 81(11): 976-979.

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

The 'resource equation method' (Mead 1988) is used to calculate the sample size for this experiment.

In this ██████ proof-of-concept study, one group of animals (T=1) will be used. Because of the complexity of the technique, we will use a sample size of 20 animals per group (N=20).

$$E = 20 - 1 = 19$$

This results in an E of 19, which is within the acceptable limit and hence can be considered as adequate sample size. Additionally, to correct for drop-outs, we include rabbits (10%) to the calculated number of rabbits. **This results into total 23 animals.**

The number of animals is calculated as one group, since the intervention and treatments in all rabbits are similar. The rabbits will be sacrificed during four weeks in smaller groups to investigate the drug levels in the tissue during treatment and to observe any damage of the treatment over time. Therefore we will use (as calculated above) 6 rabbits per week incl. drop outs.

References:

-Mead, R. (1988). The design of experiments : statistical principles for practical applications. Cambridge England ; New York, Cambridge University Press.

-Charan, J., & Kantharia, N. D. (2013). How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 4(4), 303-306. <http://doi.org/10.4103/0976-500X.119726>

B. The animals

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

The rabbit and its eye are ideally suited for ophthalmic research for several reasons. The animal is docile, easy to handle, comes in various sizes depending on the breed thus providing a range of sizes to work with. Because the rabbit eye is relatively large (Table B1) compared to e.g. the rat, it has proved useful for the assessment of both new technologies as well as ophthalmic surgical procedures (Gwon 2008). The

ocular anatomy of the rabbit (e.g. cornea, aqueous humor composition and musculature; the anterior part) is very similar to that in humans (Gwon 2008).

Table B1. Ocular sizes in several species.

	Axial Length (mm)	Corneal Thickness (mm)	Anterior Chamber Depth (mm)	Lens Thickness (mm)	Vitreous Chamber Depth (mm)	References
HUMAN	23.92	0.55	3.05	4.0	16.32	A Photon Accurate Model of the Human Eye, Deering, ACM Transactions on Graphics, 2005
RABBIT	18.1	0.4	2.9	7.9	6.2	A Schematic Eye for the Rabbit, HUGHES, Vision Research, 1972
RAT	5.98	0.25	0.87	3.87	1.51	A Revision of the Rat Schematic Eye, MASSOF and CHANG, Vision Research, 1972

The animals will be obtained from certified suppliers.

For this study we expect to use maximum 24 rabbits (incl. drop out) as shown in the statistical calculation provided by point A. Furthermore, for this study we will use adult rabbits.

References:

-Gwon, A. (2008) The rabbit in cataract/IOL surgery. In: Tsonis, P.A. (ed.) Animal models in eye research. Elsevier, pp. 184-204.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

The feasibility of the [REDACTED] for the non-invasive measurement of drug levels in the eye requires the use of living animals.

Reduction

The efficacy of [REDACTED] to measure drug levels will be tested extensively *in vitro* and *ex vivo* prior to this animal study. Based on these results, the technique will be optimized and prepared for *in vivo* use. These *in vitro* and *ex vivo* pre-screenings will reduced the total amount of animals which are needed for this [REDACTED] proof-of-concept study.

The safety of the [REDACTED] will be evaluated in the untreated eye of the same animals.

The total number of animals will be kept as low as possible, while maintaining sufficient data for statistical analysis.

Refinement

The main advantages to using rabbits as experimental models in eye research are the large size of the rabbit eye relative to its body and the several years' worth of accumulated data on the anatomy and physiology of the rabbit eye and its similarity to the human eye (Gwon 2008). Added to that, the fact that rabbits are easy to handle and breed and the most economical of the larger breed models, makes them ideal for ophthalmic research (Gwon 2008).

Most of the animal procedures are non-invasive and will be performed under hypnosis (sedation) or general anaesthesia, in order to avoid movement of the eye, discomfort and stress to the animal and to allow precise evaluation. Furthermore, the investigators involved in this project are currently improving their practical skills using sacrificed rabbits from other experiments.

References

-Gwon, A. (2008) The rabbit in cataract/IOL surgery. In: Tsonis, P.A. (ed.) Animal models in eye research. Elsevier, pp. 184-204.

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

Minimizing animal suffering

The ophthalmic examinations will be performed under general anaesthesia or hypnosis (sedation).

Whenever moderate discomfort (according to facial expression and body language, Hampshire et al, 2015) with severe ocular damage shall be observed, the coil will be removed and the rabbit will be euthanized.

Prior to the start of this study, animals will have time to acclimatize after arrival at the CPV, according to the guidelines of the CPV. During this time, daily human contact will be initiated in order to reduce stress during handling. Handling will be performed according to appropriate guidelines.

References

-V. Hampshire and S. Robertson Using the facial grimace scale to evaluate rabbit wellness in post-procedural monitoring 2015 Jul;44(7):259-60. doi: 10.1038/labani.806.

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.

██
██
██
██

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.

General anaesthesia or hypnosis (sedation) will be used during transport and during the ██████████ measurements.

In addition, ██████████ is an ██████████ which will reduce pain and prevent inflammation. Additional topical anaesthetics will be supplied before an ocular puncture.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The safety of the ██████████ technique will be investigated in this study. However, the occurrence of

inflammation and/or irritation is expected to be low. Furthermore, the coil shall be loaded with an [REDACTED] which will prevent the occurrence of inflammation.

Adverse effects related to [REDACTED] (for example transient stinging and burning on installation, hypersensitivity, headache and superficial keratitis) may occur. [REDACTED]

Explain why these effects may emerge.

These effects could emerge because of side effect of the drug.

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

During the procedures, the animals will be inspected on a daily basis.

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.

Whenever moderate discomfort (according to facial expression and body language, Hampshire et al, 2015) due to ocular damage is observed, the animals will be sacrificed for histological evaluation. Moderate discomfort is defined as ocular or conjunctival inflammation and irritation, which can not get controlled anymore (red conjunctiva with bloodshot eyes).

Indicate the likely incidence.

The occurrence of these events is expected to be low (< 10%).

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').

- All non-invasive procedures are considered 'mild'.
- The sampling methods are considered 'mild' (individual).

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.

At the end of the experiment, the eyes will be enucleated for further *ex vivo* evaluation.

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'.	10700	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Maastricht University	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 2	Type of animal procedure Ocular pharmacokinetics study

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.

We will perform a comparative *in vivo* animal cohort study evaluating the ocular pharmacokinetics of ██████ administered via an ocular coil versus eye drops. The primary outcome of the study is drug absorption into the eye by an ocular coil compared to eye drops.

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

We will perform a comparative *in vivo* animal cohort study evaluating the pharmacokinetic profile of ██████ administered via an ocular coil versus eye drops. An outline of the ocular pharmacokinetics study is presented in Table 1 and 2.

When the drug delivery matrix in the ocular coil does not deliver drugs as efficient to the eye as eye drops, the ocular coil will be revised and the study will be redone with group 2.

Study	Animal group	Intervention
Ocular pharmacokinetics study	2	██████-loaded coil
	3	██████ eye drops

Table 1. Overview of different animals groups for the ocular pharmacokinetics study.

Ocular pharmacokinetics study	Animal group 2	Animal group 3
-------------------------------	----------------	----------------

Placement of ██████-loaded coil	X	
Installation of eye drops		X
Tear fluid sampling	X	X
Blood sampling	X	X
████████████████████	X	X
Sacrifice for ex vivo analysis	X	X

Table 2. Outline of the ocular pharmacokinetics study.

Placement of ██████-loaded coil

One eye of the animal group 2 will receive an ocular coil in the lower conjunctival fornix. The ocular coil will be inserted on day 0 and will remain in the eye for four weeks. The ocular coil is filled with ██████ (group 2). Since accurate handling of the coil is necessary and proper insertion of the coil is crucial for the progress of the experiment, animals will be anesthetized to allow precise ocular coil insertion using a forceps and subsequent microscopic analysis. After insertion, the presence of the coil will be checked frequently visually and/or by touch, as far as possible. When the coil is lost, a new coil will be placed in the conjunctiva of the rabbit. This coil will be gently stitched onto the conjunctiva by an experienced ocular surgeon. This is less invasive compared to removal of the nictitating membrane, which is the alternative. Therefore we suggest using a minimal invasive stitch to attach the ocular coil to the conjunctiva.

When the average drug levels in the eye from group 2 are significantly lower compared to group 3, the design of the drug delivery matrix will be revised and the experiment will be redone with only group 2 (which will be compared with the data from the first group 3).

This since drug transport through the eye (*in vivo*) is more complex than *in vitro* drug transport. The eye is designed to keep foreign substances out of the tissue. Therefore, it is difficult to penetrate enough drugs. (Huges et al., 2005)

Instillation of eye drops

One eye per animal in group 3 will be instilled with one drop in the conjunctival sac. The eye drops will contain ██████. Installation of the eye drops can be done without anesthesia by gently restraining.

Fluids and cell sampling

Samples of the tears, aqueous humor and blood will be withdrawn and analyzed for its ██████ content. Sampling can be done without anesthesia but will be performed during anesthesia or hypnosis because the rabbit needs to be anaesthetized or hypnotized for the ophthalmic examinations (see lower part).

- Tear fluid will be collected from the cul-de-sac via a Schirmer strip or capillary tube (Small 2000, Posa 2013). The tear fluid will be analyzed in order to calculate the ocular absorption of ██████.
- Aqueous humor will be collected by inserting a needle with an attached syringe into the anterior chamber. The safety of this sampling technique has been described in the literature (Van der Lelij 1997, Cheung 2004, Trivedi 2011). The aqueous humor will be analyzed in order to calculate the ocular absorption of ██████. This will only be done when ██████ (appendix 1) does not work. Else the drug concentration will be measured with ██████.
- Blood sampling will be performed. Blood will be analyzed in order to calculate the systemic absorption of ketorolac (ocular pharmacokinetics study).

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

Ex vivo examination

After four weeks, the rabbits will be euthanized and the eyes will be enucleated for further investigation of the pharmacokinetics.

References

- Cheung, Durrani and Murray, The safety of anterior chamber paracentesis in patients with uveitis, Br J Ophthalmol. 2004 Apr; 88(4): 582–583.
- Van der Lelij A, Rothova A. Diagnostic anterior chamber paracentesis in uveitis: a safe procedure? Br J Ophthalmol 1997;81:976–9.
- Trivedi D, Denniston A and Murray P, Safety profile of anterior chamber paracentesis performed at the slit lamp, Clinical and Experimental Ophthalmology 2011; 39: 725–728
- Belen L, Violette K, Brackett J and Whitlock A, Validation of the Anterior Chamber Paracentesis Model for the Screening of Novel Ophthalmic Anti-Inflammatory Drug, IVOS 2013, Vol.54, 110
- Small D, Hevy J and Tang-Liu D. Comparison of tear sampling techniques for pharmacokinetic analysis: Ofloxacin concentration in rabbit tears after sampling with Schirmer tear strips, capillary tubes, or surgical sponges, J., Ocular Pharmacology and therapeutiics, 2000, Vol. 16, (5), 439-446.
- Posa A, Brauer L, Schicht M, Garreis F, Beileke S and Paulsen F. Schirmer strip vs. capillary tube method: Non-invasive methods of obtaining proteins from tear fluid, Annals of Anatomy, Vol.195, (2),137–142
- Diehl K, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J and van de Vorstenbosch C, A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes, J. Appl. Toxicol. 2001, 21, 15–23.
- NCR3 guidelines, <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>
- Thakur RR and Kashiv M, Modern Delivery Systems for Ocular Drug Formulations: A comparative Overview W.R.T Conventional Dosage Form, IJPBR 2011, 2 (1) 8-18.

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

The 'resource equation method' (Mead 1988) is used to calculate the sample size for this experiment.

We calculated that a group size of 8 will adequate for our study, with 10% drop out. Therefore, 16 rabbits will be used with 2 spare rabbits, which brings it to 18 rabbits total.

When the results in the first trial are significantly lower compared to the eye drop group, the experiment will be repeated with 9 rabbits (incl. 10% drop outs), after optimization of the ocular coil drug delivery matrix *in vitro*.

References:

- Mead, R. (1988). The design of experiments : statistical principles for practical applications. Cambridge England ; New York, Cambridge University Press.
- Charan, J., & Kantharia, N. D. (2013). How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 4(4), 303–306. <http://doi.org/10.4103/0976-500X.119726>

B. The animals

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

The rabbit and its eye are ideally suited for ophthalmic research for several reasons. The animal is docile, easy to handle, comes in various sizes depending on the breed thus providing a range of sizes to work with. Because the rabbit eye is relatively large (Table 1B), it has proved useful for the assessment of both new technologies as well as ophthalmic surgical procedures (Gwon 2008). The ocular anatomy of the rabbit (e.g. cornea, aqueous humor composition and musculature; the anterior part of the eye) is very similar to that in human (Gwon 2008, Thakur 2011).

Table B1. Ocular sizes in several species.

	Axial Length (mm)	Corneal Thickness (mm)	Anterior Chamber Depth (mm)	Lens Thickness (mm)	Vitreous Chamber Depth (mm)	References
HUMAN	23.92	0.55	3.05	4.0	16.32	A Photon Accurate Model of the Human Eye, Deering, ACM

						Transactions on Graphics, 2005
RABBIT	18.1	0.4	2.9	7.9	6.2	A Schematic Eye for the Rabbit, HUGHES, Vision Research, 1972
RAT	5.98	0.25	0.87	3.87	1.51	A Revision of the Rat Schematic Eye, MASSOF and CHANG, Vision Research, 1972

The animals will be obtained from certified suppliers.

Young rabbits tend to have a greater postoperative inflammatory response, which is greater than that observed in adult human eyes and characterized by a heavy fibrin reaction (Gwon 2008). As such, adult rabbits will be used in this study.

We estimate to use approximately 9 animals per animal group (including the drop-out), with a maximum of forty-five (maximum four ocular coil revising's) animals.

We will not use the contralateral eyes, so no animals will experience loss of vision during the course of the study, as described in the ARVO guidelines for animal use during visual and ophthalmic experiments.

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

Evaluation of the ocular pharmacokinetics of drug delivery requires the use of living animals. *In vitro* systems are not sufficient in evaluating the ocular pharmacokinetics of a new drug delivery device. Furthermore, an ocular pharmacokinetics study in animals is required for future drug approval (European Medicine Agency).

Reduction

The level of drug release from the ocular coil will be tested extensively *in vitro* prior to this animal study. Based on the *in vitro* results, a selection of the best prototype(s) will be made. These coil(s) will be further subjected to the ocular pharmacokinetics study. This *in vitro* pre-screening reduces the total amount of animals which are needed for this ocular pharmacokinetics study.

Refinement

The main advantages to using rabbits as experimental models in eye research are the large size of the rabbit eye relative to its body and the several years' worth of accumulated data on the anatomy and physiology of the rabbit eye and its similarity to the human eye (Gwon 2008, Thakur 2011). Added to that, the fact that rabbits are easy to handle and breed and the most economical of the larger breed models, makes them ideal for ophthalmic research (Gwon 2008).

Most of the animal procedures are non-invasive and will be performed under hypnosis or general anesthesia, in order to avoid movement of the eye, discomfort and stress to the animal and to allow precise evaluation. Furthermore, the investigators involved in this project are currently improving their

practical skills using sacrificed rabbits.

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

Minimizing animal suffering

The ophthalmic examinations will be performed under general anaesthesia or hypnosis.

Whenever moderate discomfort (according to facial expression and body language, Hampshire et al, 2015) due to ocular damage (because of the ocular coil or due to one of the interventions) is observed, the animals will be sacrificed for histological evaluation.

Moderate discomfort is defined as ocular or conjunctival inflammation and irritation, which can not get controlled anymore (red conjunctiva with bloodshot eyes). Enucleation of the eye is the only possibility to prevent systemic inflammation.

Prior to the start of this study, animals will have time to acclimatize after arrival at the CPV. During this time, daily human contact will be initiated in order to reduce stress during handling. Handling will be performed according to appropriate guidelines.

The contralateral eye will not be used, so no animals will experience complete loss of vision during the study. This according to the ARVO and NIH guidelines for animal use in ophthalmic experiments.

References

-V. Hampshire and S. Robertson Using the facial grimace scale to evaluate rabbit wellness in post-procedural monitoring **2015** Jul;44(7):259-60. doi: 10.1038/labani.806.

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.

General anaesthesia or hypnosis will be used during sampling. In addition, [REDACTED] is an [REDACTED] which will reduce pain and prevent inflammation. For some interventions, (e.g. cornea puncture and aqueous humor sampling) also topical anaesthetic will be applied in combination with general anaesthesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The occurrence of inflammation and/or irritation due to the coil is expected to be low. Furthermore, the coil shall be loaded with an [REDACTED], which will prevent the occurrence of inflammation. Adverse effects related to [REDACTED] (for example transient stinging and burning on installation, hypersensitivity, headache (in humans) and superficial keratitis) may occur but only in rare cases.

Explain why these effects may emerge.

Due to the absorption of [REDACTED]

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

During the procedures, the animals will be inspected on a daily basis. The rabbits (both groups) receive [REDACTED] which should keep them without pain.

Furthermore, the investigators are trained on rabbits, sacrificed in other experiments to assure minimal severity because of wrong handling.

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.

Whenever moderate discomfort (according to facial expression and body language, Hampshire et al, 2015) due to ocular damage is observed, the coil will be removed and the animals will be sacrificed for histological evaluation.

Moderate discomfort is defined as ocular or conjunctival inflammation and irritation, which can not get controlled anymore (red conjunctiva with bloodshot eyes).

Indicate the likely incidence.

The occurrence of these events is expected to be low (< 10%).

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').

- All non-invasive procedures are considered 'mild'
- The sampling methods are considered 'mild' (individual)
- We expect that the animals will be anesthetized/hyponosed for 10 to 15 time during a period of 4 weeks.
- All sampling methods together are considered 'moderate' (cumulative)

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.

At the end of the experiment, the eyes will be enucleated for further *ex vivo* evaluation.

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'.
- 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 |
|---------------|--------------------------|
| 3 | Ocular efficacy study |

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.

We will perform a comparative *in vivo* animal cohort study evaluating the ocular efficacy of ██████ administered via an ocular coil versus eye drops in an inflammation model. The primary outcome of the study is prevention of ocular inflammation.

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

We will perform a comparative *in vivo* animal cohort study evaluating the ocular efficacy of ██████ administered via an ocular coil versus eye drops in an inflammation model. An outline of the ocular efficacy study is presented in Table 1 and 2.

Study	Animal group	Intervention
Ocular efficacy study	4	██████-loaded coil
	5	██████ eye drops
	6	Untreated control

Table 1. Overview of different animals groups for the ocular efficacy study.

Ocular efficacy study	Animal group 4	Animal group 5	Animal group 6
Induction of inflammation	X	X	X
Placement of [REDACTED] loaded coil	X		
Installation of [REDACTED] eye drops		X	
Tear fluid sampling	X	X	X
Aqueous humor sampling / [REDACTED] [REDACTED]	X	X	X
Blood sampling	X	X	X
Cell sampling	X	X	X
Ophthalmic examinations	X	X	X
Sacrifice for <i>ex vivo</i> analysis	X	X	X

Table 2. Outline of the ocular efficacy study.

Induction of inflammation

Since rabbits develop a strong immune response towards ocular damage, a small incision (or puncture) in the ocular tissue can lead to a reaction similar to that in humans after anterior chamber surgery (Bito, 1984). To mimic the eventual application of the ocular coil, an incision in the cornea should be made. Due to the breach of the cornea, the immune system will be triggered to regenerate the tissue and not only the ocular epithelium. The [REDACTED] filled ocular coil (and the eye drops too, see fig. 1) should prevent any over-active immune response leading to inflammation (and scar formation). This situation creates an accurate way to investigate drug efficacy.

When we only damage the outer-layer of the cornea, the endothelial cells are not affected and the cornea recovers faster. This differs too much from a cataract surgery and results in different complications compared to a cornea puncture.



Placement of [REDACTED] coil

One eye of the animal groups 4 will receive an ocular coil in the lower conjunctival fornix. The ocular coil will be inserted on day 0. The ocular coil is filled with [REDACTED]. Since accurate handling of the coil is necessary and proper insertion of the coil is crucial for the progress of the experiment, animals will be

anesthetized or hypnotized to allow precise ocular coil insertion using a forceps and subsequent microscopic analysis. After insertion, the presence of the coil will be checked frequently visually and/or by touch, as far as possible. When the coil is lost, a new ocular coil will be inserted and gently stitched onto the conjunctiva to prevent further loss.

Instillation of eye drops

One eye of the animals in group 5 will be instilled with one drop in the conjunctival sac. The eye drops will contain [REDACTED]. Installation of the eye drops can be done without anesthesia by gently restraining.

Fluids and cell sampling

Samples of the tears, aqueous humor and blood will be withdrawn and analyzed for inflammatory factors. Sampling can be done without anesthesia but will be performed during anesthesia because the rabbit needs to be anaesthetized for the ophthalmic examinations (see lower part).

- Tear fluid will be collected from the cul-de-sac via a Schirmer strip or capillary tube (Small 2000, Posa 2013). The tear fluid will be analyzed for inflammatory factors.
- Aqueous humor will be collected by inserting a needle with an attached syringe into the anterior chamber. The safety of this sampling technique has been described in the literature (Van der Lelij 1997, Cheung 2004, Trivedi 2011). The aqueous humor will be analyzed for inflammatory factors. Drug concentrations will be measured with [REDACTED] when the study in appendix 1 proves the technique is suitable and accurate enough.
- Blood sampling will be performed according to the NC3R guidelines. Blood will be analyzed for inflammatory factors.
- Epithelial cells from the ocular surface will be collected by impression cytology in a non-invasive way (Singh 2005). Cells will be further subjected to (immuno) cytological analysis and analyzed for inflammation.

Ophthalmic examinations

Inflammation will be assessed by several ophthalmic examinations (for example slit-lamp microscopy, tonometry and optical coherence tomography) (animal groups 4, 5 and 6). All ophthalmic examinations are non-invasive but will be performed under hypnosis or general anesthesia in order to avoid movement of the eye, discomfort and stress to the animal and to allow precise evaluation.

- With the aid of slit-lamp microscopy, the ocular status can be determined. Slit-lamp findings may be graded based on the methods of McDonald and Shaddock (Gwon 2008, McDonald and Shaddock 1977).
- Tonometry is the measurement of the intraocular pressure (IOP). A tonometer can measure the counter pressure when the probe gently touches the cornea. Intraocular inflammation is the most common cause of ocular hypotension.
- Optical coherence tomography (OCT) is a medical imaging technique to take cross-section pictures of the eye. OCT can be used to detect inflammation, irritation or other ocular changes.

Ex vivo examination

In the end, the rabbits will be euthanized and the eyes will be enucleated for further investigation of inflammation.

References

-Cheung, Durrani and Murray, The safety of anterior chamber paracentesis in patients with uveitis, *Br J Ophthalmol.* 2004 Apr; 88(4): 582–583.

-Van der Lelij A, Rothova A. Diagnostic anterior chamber paracentesis in uveitis: a safe procedure? *Br J Ophthalmol* 1997;81:976–9.

-Trivedi D, Denniston A and Murray P, Safety profile of anterior chamber paracentesis performed at the slit lamp, *Clinical and Experimental Ophthalmology* 2011; 39: 725–728

-Belen L, Violette K, Brackett J and Whitlock A, Validation of the Anterior Chamber Paracentesis Model for the Screening of Novel Ophthalmic Anti-Inflammatory Drug, *IVOS 2013, Vol.54, 110*

-Small D, Hevy J and Tang-Liu D. Comparison of tear sampling techniques for pharmacokinetic analysis: Ofloxacin concentration in rabbit tears after sampling with Schirmer tear strips, capillary tubes, or surgical sponges, *J. Ocular Pharmacology and therapeutics*, 2000, Vol. 16, (5), 439-446.

-Posa A, Brauer L, Schicht M, Garreis F, Beileke S and Paulsen F. Schirmer strip vs. capillary tube method: Non-invasive methods of obtaining proteins from tear fluid, *Annals of Anatomy*, Vol.195, (2),137–142

-Diehl K, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal J and van de Vorstenbosch C, A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes, *J. Appl. Toxicol.* 2001, 21, 15–23.

-NCR3 guidelines, <https://www.nc3rs.org.uk/blood-sample-volumes>

Thakur RR and Kashiv M, Modern Delivery Systems for Ocular Drug Formulations: A comparative Overview W.R.T Conventional Dosage Form, *IJPBR* 2011, 2 (1) 8-18.

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

The 'resource equation method' (Mead 1988) is used to calculate the sample size for this experiment. This method is used when it is not possible to assess or assume the effect size and standard deviation, as no previous findings are available. Furthermore, it is used when complex statistical procedures are used for analysis. With this method a value "E" is calculated, which in fact is the degree of freedom of analysis of variance (ANOVA).

In this ocular efficacy study, three groups of animals (T=3) will be used. If we use a group size of 7 animals (N=3*7=21), E = 21-3 = 18 which is within the acceptable limit and hence can be considered as adequate sample size. Additionally, a drop out of 10% will be included. This results in a total sample size of 24 animals (8 animals per group).

References:

-Mead, R. (1988). *The design of experiments : statistical principles for practical applications.* Cambridge England ; New York, Cambridge University Press.

-Charan, J., & Kantharia, N. D. (2013). How to calculate sample size in animal studies? *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*, 4(4), 303–306. <http://doi.org/10.4103/0976-500X.119726>

B. The animals

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

The rabbit and its eye are ideally suited for ophthalmic research for several reasons. The animal is docile, easy to handle, comes in various sizes depending on the breed thus providing a range of sizes to work with. Because the rabbit eye is relatively large (Table B1), it has proved useful for the assessment of both new technologies as well as ophthalmic surgical procedures (Gwon 2008). The ocular anatomy of the rabbit (e.g. cornea, aqueous humor composition and musculature) is very similar to that in men (Gwon 2008, Thakur 2011).

We estimate to use approximately eight animals per animal group (including the drop-out), with a maximum of twenty-four animals.

Table B1. Ocular sizes in several species.

	Axial Length (mm)	Corneal Thickness (mm)	Anterior Chamber Depth (mm)	Lens Thickness (mm)	Vitreous Chamber Depth (mm)	References
HUMAN	23.92	0.55	3.05	4.0	16.32	A Photon Accurate Model of the Human Eye, Deering, ACM Transactions on Graphics, 2005
RABBIT	18.1	0.4	2.9	7.9	6.2	A Schematic Eye for the Rabbit, HUGHES, Vision Research, 1972
RAT	5.98	0.25	0.87	3.87	1.51	A Revision of the Rat Schematic Eye, MASSOF and CHANG, Vision Research, 1972

The animals will be obtained from certified suppliers.

We will not use the contralateral eyes as stated in the ARVO and NIH guidelines for animal research, so none of the animals will experience bilateral loss of vision during the course of the study.

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

Evaluation of the ocular efficacy requires the use of living animals. *In vitro* systems are not sufficient in evaluating the ocular efficacy of a new drug delivery device. Furthermore, an ocular pharmacokinetics study in animals is required for future drug approval (European Medicine Agency).

Reduction

The level of drug release from the ocular coil will be tested extensively *in vitro* prior to this animal study. Based on the *in vitro* results, a selection of the best prototype(s) will be made. These coil(s) will be further subjected to the *in vivo* ocular pharmacokinetics study. If *in vivo* drug release is sufficient, this ocular efficacy study will start to demonstrate the efficacy of the ocular coil in treating inflammation. Both, the *in vitro* and *in vivo* pharmacokinetic studies reduce the total amount of animals which are needed for this ocular efficacy study.

The total number of animals will be kept as low as possible, while maintaining sufficient data for statistical analysis.

Refinement

The main advantages to using rabbits as experimental models in eye research are the large size of the

rabbit eye relative to its body and the several years' worth of accumulated data on the anatomy and physiology of the rabbit eye and its similarity to the human eye (Gwon 2008, Thakur 2011). Added to that, the fact that rabbits are easy to handle and breed and the most economical of the larger breed models, makes them ideal for ophthalmic research (Gwon 2008).

Most of the animal procedures are non-invasive and will be performed under hypnosis or general anaesthesia, in order to avoid movement of the eye, discomfort and stress to the animal and to allow precise evaluation. Furthermore, the investigators involved in this project are currently improving their practical skills using sacrificed rabbits.

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

Minimizing animal suffering

The ophthalmic examinations will be performed under hypnosis or general anaesthesia.

Whenever moderate discomfort (according to facial expression and body language, Hampshire et al, 2015) with severe ocular damage shall be observed, the coil will be removed and the rabbit shall be euthanized for histological examination.

Prior to the start of this study, animals will have time to acclimatize after arrival at the CPV. During this time, daily human contact will be initiated in order to reduce stress during handling. Handling will be performed according to appropriate guidelines.

The contralateral eyes will not be used, so no animals experience complete loss of vision during the study.

References

-V. Hampshire and S. Robertson Using the facial grimace scale to evaluate rabbit wellness in post-procedural monitoring 2015 Jul;44(7):259-60. doi: 10.1038/labam.806.

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.

General anaesthesia will be used during the aqueous humor sampling and during the corneal puncture. In addition, [REDACTED] is an [REDACTED] which will reduce pain and prevent inflammation; other analgesics will be provided (oral) to lower the pain in group 6.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Adverse effects related to [REDACTED] (for example transient stinging and burning on installation, hypersensitivity, headache and superficial keratitis) may occur. [REDACTED]

Explain why these effects may emerge.

Due to the absorption of [REDACTED]

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

The animals will be followed-up on a regular basis.

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.

Whenever moderate discomfort is observed in group 4 and group 5 (according to facial expression and body language, Hampshire et al, 2015) due to ocular damage, the animals will be sacrificed for histological evaluation. Moderate discomfort, for these groups, is defined as ocular or conjunctival inflammation and irritation, which can not get controlled anymore (red conjunctiva with bloodshot eyes). Enucleation of the eye is the only possibility to prevent systemic inflammation.

Since we do not treat the control group for this experiment, we will sacrifice the control animals when the inflammation affects the rabbits vision. Thus, when the cornea starts to be affected (determined by slit lamp examination), the conjunctiva is swollen (and red) and the rabbits shows signs of discomfort (pull back reflex) when touching tissue near to the ocular region.

Indicate the likely incidence.

The occurrence of these events is expected to be low (< 10%).

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').

- All non-invasive procedures are considered 'mild'
- Inducing ocular damage to induce inflammation is considered 'mild' in all groups.
- Living with ocular or conjunctival inflammation for the control group (6) is considered 'moderate' and for the treated groups (4 and 5) 'mild'
- The sampling methods are considered 'mild' (individual).
- We expect that the animals will be anesthetized/hyponosed for 10 to 15 time during a period of 4

weeks.

- Cumulative discomfort for group 4 and 5 is mild while the cumulative discomfort for group 6 is graded as 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.

At the end of the experiment, the eyes will be enucleated for further *ex vivo* evaluation.

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 Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD107002017829

Bijlagen

2

Datum 19 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 19 januari 2017. Het gaat om uw project "Evaluation of adrug-loaded ocular coil for sustained drug delivery to the eye". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD107002017829. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

19 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD107002017829

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Datum:

19 januari 2017

Aanvraagnummer:

DEC07002017829

Over uw project

Geplande startdatum:

1 februari 2017

Geplande einddatum:

1 februari 2022

Titel project:

Evaluation of adrug-loaded ocular coil for sustained drug delivery to the eye

Titel niet-technische samenvatting:

Evaluatie van een oculaire coil voor gereguleerde geneesmiddelenafgifte aan het oog

Naam DEC:

DEC-UM

Postadres DEC:

Postbus 616, 6200 MD Maastricht

E-mailadres DEC:

secretariaat.dec@maastrichtuniversity.nl

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:

- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

Maastricht

Datum:

19 januari 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht

Postbus 616

6200 MD MAASTRICHT



**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
AVD107002017829

Bijlagen

2

Datum 19 januari 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 19 januari 2017

Vervaldatum: 18 februari 2017

Factuurnummer: 170829

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD107002017829	€ 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.

[Redacted]

Van: [Redacted]
Verzonden: woensdag 8 maart 2017 15:54
Aan: 'Info-zbo'
CC: [Redacted]
Onderwerp: RE: vragen bij de behandeling van projectaanvraag AVD107002017829

Categorieën: Dossier: [Redacted]

Beste mevrouw [Redacted]
Gelieve in bijlage de aangepaste documenten terug te vinden. De aanpassingen zijn aangegeven in een rode kleur. In het eerste document (aanvraag projectvergunning) is de einddatum aangepast naar december 2018 (dit kon niet in kleur omdat het document dit niet toelaat).
Met vriendelijke groeten,
[Redacted]

Van: Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]
Verzonden: woensdag 8 maart 2017 15:23
Aan: [Redacted]
CC: [Redacted]
Onderwerp: RE: vragen bij de behandeling van projectaanvraag AVD107002017829

Beste mevrouw [Redacted]
De antwoorden op onze vragen zijn goed ontvangen. Vrijdag 10 maart zal de CCD uw aanvraag behandelen. Kunt u waar van toepassing de bijlagen dierproeven en de NTS herzien en uw antwoorden daarin opnemen? Zoals een aanpassing van het ongerief, het aantal malen anesthesie en de dieraantallen?
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!)

Van: [Redacted]
Verzonden: maandag 6 maart 2017 16:47
Aan: 'info@zbo-ccd.nl'
CC: [Redacted]
Onderwerp: FW: vragen bij de behandeling van projectaanvraag AVD107002017829

Geachte [Redacted],
Gelieve in bijlage een antwoord op onderstaande vragen m.b.t. projectaanvraag AVD107002017829 terug te vinden.
Met vriendelijke groet,
[Redacted]
[Redacted]

Van: Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>
Datum: 21 februari 2017 09:40:41 CET
Aan: [Redacted]
Onderwerp: vragen bij de behandeling van projectaanvraag AVD107002017829

Geachte [Redacted],
U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend, bij de behandeling hiervan hebben wij een aantal vragen. Het betreft uw project 'Evaluation of a drug loaded ocular coil for sustained drug delivery to the eye' met aanvraagnummer AVD107002017829.
In de bijlagen dierproeven beschrijft u 'hypnosis' als methode om de konijnen te immobiliseren. Wat bedoelt u hier precies mee, en wanneer dit hier iets anders bedoeld wordt dan sedatie door het injecteren van een middel kunt u dan beschrijven wat deze methode precies inhoudt?
In bijlage 3.4.4.1 komt uit de berekening van het benodigd aantal dieren dat u 23 dieren nodig heeft, toch vraagt u 24 dieren aan. U kunt slechts zoveel dieren inzetten als nodig zijn, op basis van de statistische berekening, om de resultaten te behalen.
In bijlage 3.4.4.2 beschrijft u twee experimentele groepen, de groep die een coil geïmplanteed krijgt en een controle groep die alleen oogdruppels krijgt toegediend. U beschrijft dat u van de konijnen slechts een oog gebruikt. De door u genoemde ARVO guidelines beschrijven het

vermijden van invasieve ingrepen aan beide ogen met grote kans op schade en blindheid. In het kader van vermindering is de CCD van mening dat in deze bijlage het wel mogelijk is om beide ogen van het konijn te gebruiken. De effecten van de oogdruppels op zich zijn bekend, en zullen naar verwachting geen schade aan het oog veroorzaken en u neemt de monsters af onder anesthesie. Kunt u dit nader toelichten?

U beschrijft in bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.3 bij de ongeriefclassificatie dat het cumulatief ongerief Licht is, uit de beschrijving volgt dat de dieren meerdere malen onder anesthesie gaan ten behoeve van bemonstering en mogelijk terugplaatsen van een coil wanneer deze verloren is gegaan. Kunt u het maximaal aantal keren dat een konijn mogelijk onder anesthesie gaat aangeven en in overweging nemen, in overleg met de IvD, dat dit maakt dat het cumulatief ongerief als matig gezien moet worden?

U vraagt een looptijd van 5 jaar aan voor dit project, gezien het aantal experimenten en de duur van de experimenten lijkt dit lang. Kun u een looptijd van 5 jaar meer onderbouwen?

U heeft 14 dagen om uw aanvraag aan te vullen. De behandeltijd is opgeschort totdat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen.

Vriendelijke groet, [REDACTED]

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven

www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Bezuidenhoutseweg 73 2594 AC Den Haag
Postbus 20401 2500 EK Den Haag

.....
[REDACTED]
[REDACTED]
Afwezig op vrijdag in de oneven weken

This email and any attachments may contain confidential or privileged information and is intended for the addressee only. If you are not the intended recipient, please immediately notify us by email or telephone and delete the original email and attachments without using, disseminating or reproducing its contents to anyone other than the intended recipient. The Maastricht UMC+ shall not be liable for the incorrect or incomplete transmission of this email or any attachments, nor for unauthorized use by its employees.

Maastricht, 6 maart 2017

Van: Maastricht Universiteit,

[REDACTED]

Postbus 616

6200MD Maastricht

E-mail: [REDACTED]

9.

Aan: Centrale Commissie Dierproeven

t.a.v. [REDACTED]

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

E-mail: [REDACTED]

Betreft: Vragen bij de behandeling van projectaanvraag AVD107002017829

Geachte mevrouw [REDACTED]

Naar aanleiding van uw reactie van 21 februari 2017 vindt u hierbij ons antwoord op de gevraagde punten. Het betreft het project 'Evaluation of a drug loaded ocular coil for sustained drug delivery to the eye' met aanvraagnummer AVD107002017829.

In de bijlagen dierproeven beschrijft u 'hypnosis' als methode om de konijnen te immobiliseren. Wat bedoelt u hier precies mee, en wanneer dit hier iets anders bedoeld wordt dan sedatie door het injecteren van een middel kunt u dan beschrijven wat deze methode precies inhoudt?

Met hypnose bedoelen we inderdaad sedatie of lichte anesthesie om het bewustzijn van de dieren te verlagen. De reden waarom we voor hypnose kiezen is omdat hypnose minder belastend is dan algehele anesthesie. Op deze manier wordt het totale ongerief voor de dieren verlaagd.

In bijlage 3.4.4.1 komt uit de berekening van het benodigd aantal dieren dat u 23 dieren nodig heeft, toch vraagt u 24 dieren aan. U kunt slechts zoveel dieren inzetten als nodig zijn, op basis van de statistische berekening, om de resultaten te behalen.

Valide punt. We zullen 23 dieren aanvragen i.p.v. 24.

In bijlage 3.4.4.2 beschrijft u twee experimentele groepen, de groep die een coil geïmplantemd krijgt en een controle groep die alleen oogdruppels krijgt toegediend. U beschrijft dat u van de konijnen slechts een oog gebruikt. De door u genoemde ARVO guidelines beschrijven het vermijden van invasieve ingrepen aan beide ogen met grote kans op schade en blindheid. In het kader van vermindering is de CCD van mening dat in deze bijlage het wel mogelijk is om beide ogen van het konijn te gebruiken. De effecten van de oogdruppels op zich zijn bekend, en zullen naar verwachting geen schade aan het oog veroorzaken en u neemt de monsters af onder anesthesie. Kunt u dit nader toelichten?

De reden waarom de dieren niet aan beide ogen kunnen worden behandeld, is omdat deze (farmacokinetiek) studie ook de systemische opname van het geneesmiddel wenst te evalueren. Onderzoek naar de systemische opname van geneesmiddelen (na lokale toediening) is belangrijk omdat systemische opname vaak leidt tot neveneffecten en bijwerkingen. Met name oogdruppels zijn gekend voor hun lage lokale absorptie (< 5%) en significante systemische opname van de actieve bestanddelen. In dit kader wensen we de systemische opname van het geneesmiddel te vergelijken na vrijgave uit de coil of via oogdruppels. Indien de coil een hoger percentage geneesmiddel vrijgeeft aan het oog (en dus minder systemisch), versterkt dit rol van de coil als waardevol alternatief voor oogdruppels.

Daarnaast houden we er rekening mee dat, indien de [REDACTED] (studie 1) niet optimaal functioneert, we frequent voorkamervocht (aqueous humor) zullen moeten afnemen door middel van (invasieve) injecties in het oog. We willen voorkomen dat de dieren frequent en bilateraal geïnjecteerd moeten worden.

U beschrijft in bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.3 bij de ongeriefclassificatie dat het cumulatief ongerief Licht is, uit de beschrijving volgt dat de dieren meerdere malen onder anesthesie gaan ten behoeve van bemonstering en mogelijk terugplaatsen van een coil wanneer deze verloren is gegaan. Kunt u het maximaal aantal keren dat een konijn mogelijk onder anesthesie gaat aangeven en in overweging nemen, in overleg met de IvD, dat dit maakt dat het cumulatief ongerief als matig gezien moet worden?

In overleg met de IvD, gaan we akkoord om het cumulatief ongerief aan te passen naar *moderate* (in plaats van *mild*). We verwachten dat de dieren een 10 à 15 keer binnen een periode van 4 weken onder anesthesie (of hypnose/sedatie) zullen gebracht worden.

U vraagt een looptijd van 5 jaar aan voor dit project, gezien het aantal experimenten en de duur van de experimenten lijkt dit lang. Kun u een looptijd van 5 jaar meer onderbouwen?

Op het moment van schrijven is de oculaire coil nog niet volledig af. Het prototype is opgeleverd, maar de optimalisatie dient nog te gebeuren. Om hierop te anticiperen hebben wij een ruime tijd in overweging genomen. We gaan akkoord met een kortere termijn. Een einddatum van december 2018 is realistischer.

Hoogachtend en met vriendelijke groeten,

[REDACTED]

[REDACTED]

DEC-advies PV 2015-019 [REDACTED]

Preambule:

Alle vragen met betrekking tot de vernieuwde [REDACTED]”, acht de aanvrager vertrouwelijk indachtig artikel 10 lid 1 aanhef en onder f en g van de Wet Openbaarheid van Bestuur, totdat het patent ingediend en volledig goedgekeurd is.

De DEC-UM verzoekt U eventuele aanvullende vragen rechtstreeks aan de aanvrager te stellen met een afschrift aan de DEC-UM.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. **Aanvraagnummer:** 10700
2. **Titel van het project:** *Evaluation of a drug-loaded ocular coil for sustained drug delivery to the eye.*
3. **Titel van de NTS:** *Evaluatie van een oculaire coil voor gereguleerde geneesmiddelenafgifte aan het oog.*
4. **Type aanvraag:**
 - nieuwe** aanvraag projectvergunning
5. **Contactgegevens DEC:**
 - naam DEC; *DEC-UM*
 - telefoonnummer contactpersoon; [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon; [REDACTED]
6. **Adviestraject:** (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC-UM 03-11-2016
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken 11-11-2016
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD
7. **Afstemming IvD:**
 - De aanvrager heeft het projectvoorstel afgestemd met de IvD *dd. 03-11-2016*.
8. **Eventueel horen van aanvrager:** *N.V.T.*
9. **Correspondentie met de aanvrager:**
 - Datum 16-11-2016
 - Gestelde vragen:

3.4 Onderzoeksstrategie

3.4.1

Vragen:

1. *Kan er een systemisch effect optreden na toedienen drug in 1 oog via bijvoorbeeld de retro-orbitale plexus? Indien dit kan, is het dan niet beter om een baseline versus drug toediening te analyseren?*

Antwoord:

Uit literatuur is gebleken dat een systemisch effect, veroorzaakt door ██████████ ██████████, mogelijk is, al is de kans hierop verwaarloosbaar klein. Daarnaast is er bewust gekozen voor ██████████ omdat dit medicijn al langer op de markt is en de bijwerkingen goed in kaart gebracht zijn [voor details verwijzen wij u naar de website van het Lareb, 8-12-2016 laatste raadpleging, bijgewerkt op 6-12-2016]. Hierdoor is het niet nodig een baseline versus drug toediening te analyseren, maar kan er gefocust worden op de afgifte van medicijn door de oculaire coil. Overigens wordt bij het eerste onderzoek (zie appendix 1) de baseline van ██████████ in kaart gebracht door middel van oogdruppels. Deze data worden gebruikt in de verdere experimenten.

2. *Waarom wordt gekozen in de eerste onderzoeksvraag om oogdruppels toe te dienen. Uit de background maakt de DEC-UM op dat er reeds een coil beschikbaar is, maar dat een nieuwe (meer flexibelere) coil getest wordt. Is het niet handiger om het gebruik van ██████████ te testen in een reeds bestaande coil.*

Antwoord:

Binnen de oogheelkunde zijn oogdruppels momenteel de gouden standaard voor het toedienen van medicatie. Het is echter nog niet duidelijk hoe deze concentraties nauwkeurig en niet-invasief gemeten kunnen worden. Vandaar dat de afdeling oogheelkunde een ██████████ ontwikkeld en gepatenteerd heeft, om met deze ██████████ nauwkeurige medicijn concentraties te meten door middel van ██████████. De ██████████ methode is afgelopen jaren geoptimaliseerd binnen de afdeling oogheelkunde, echter zijn er nog geen *in vivo* studies gedaan. Om de de ██████████ optimaal af te stellen en te testen voor de volgende studies (appendici 2 en 3) is gekozen voor het meten van medicijn concentraties met oogdruppels (gouden standaard voor het toedienen van medicatie).

De ‘oude’ oculaire coil waarover gesproken wordt in de aanvraag is het start-/uitgangproduct voor de ontwikkeling van de huidige oculaire coil. Het concept is hetzelfde gebleven, een oculaire coil voor medicijn afgifte, maar de nieuwe oculaire coil heeft een vernieuwde coating, een andere diameter, de flexibiliteit is verhoogd en medicijn afgifte is anders gereguleerd. Tevens is de duur van de medicijn afgifte anders bij de huidige oculaire coil in vergelijking met de oude versie. De ‘oude’ oculaire coil is daarom niet vergelijkbaar met de ‘nieuwe’ oculaire coil en derhalve niet geschikt om te gebruiken in deze studies.

3. *Dient er binnen de tweede onderzoeksvraag ook een vergelijking gemaakt te worden met de eerste-generatie coils of worden hiervoor historische controles gebruikt? Er wordt namelijk een tweede generatie coils getest.*

Antwoord:

Zoals hierboven aangegeven is de ‘oude’ oculaire coil niet vergelijkbaar met de ‘nieuwe’ oculaire coil. De ‘oude’ oculaire coil is het start-/uitgangproduct waarop de nieuwe oculaire coil gemaakt is. Door veranderingen in onder andere de coating, diameter, flexibiliteit en medicijn afgifte kan dit gezien worden als een nieuw product.

4. *Wordt er reeds van uitgegaan dat ██████████ niet zal werken? When the drug concentrations in the AH samples are significantly lower than...*

Antwoord:

De *in vitro* en *ex vivo* resultaten van [REDACTED] zijn veel belovend maar de vertaling van *in vitro* en *ex vivo* naar *in vivo* blijkt moeilijk te zijn, zoals aangetoond in de literatuur ([REDACTED]). Dit is de eerste studie waarbij de door ons ontwikkelde [REDACTED] *in vivo* getest zal worden.

5. *Kan er reeds een inschatting gemaakt worden of er lagere drug concentraties mogelijk zijn door de opbouw van de matrix? Het strategie punt II zou hier een antwoord op moeten geven.*

Antwoord:

Momenteel is de medicijn afgifte matrix nog in ontwikkeling bij de TU/e. Er is, in samenwerking met de afdeling farmacologie en door een uitgebreide literatuur studie, gekeken naar de effectieve dosis van [REDACTED]. Aan de hand hiervan wordt de medicijn matrix verder ontwikkeld. De intra-oculaire concentraties van [REDACTED] moeten gelijk zijn aan die van oogdruppels, waar de concentratie buiten de cornea lager kunnen zijn ten opzichte van oogdruppels vanwege gereguleerde continue medicijn afgifte.

3.4.2

Vragen:

1. *Waarom wordt AH sampling niet gedaan bij het onbehandelde oog (table 4)? Is er bewijs dat er geen systemische release voorkomt?*

Antwoord:

Omdat oogdruppels lokaal werken, is het niet nodig AH samples te nemen van het contralaterale oog. Daarnaast schrijven de richtlijnen van the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) voor, dat een bilaterale behandeling van ogen bij proefdieren goed overwogen moet worden, alvorens toegepast, omdat deze dierenleed significant verhogen wanneer complicaties ontstaan.

Waarom wordt bloed sampling gedaan?

Antwoord:

Bloedmonsters worden afgenomen voor ontstekingsonderzoek. Hiermee kijken we naar verhoogde cytokine waardes en ontstekingscellen ter indicatie van de algehele gezondheid van het konijn. Daarnaast wordt ook de concentratie systemisch vrijgegeven medicijn onderzocht.

2. *De suggestie wordt gecreëerd dat AH sampling naast bloed sampling sowieso gebeurt om lokale en systemische drug concentraties te bepalen, ook al kan [REDACTED] gebruikt worden?*

Antwoord:

Wanneer [REDACTED] aantoonbaar werkt, zal dit gebruikt worden om de medicijn kwantiteit in het oog aan te tonen. Er zal in dat geval geen AH afname gedaan worden.

3. *Wordt de ideale opbouw van de matrix niet bepaald m.b.v. in vitro experimenten (strategie punt 2), waardoor een eventuele extra groep toevoegen niet nodig is?*

Antwoord:

Er zullen *in vitro* experimenten uitgevoerd worden om te voorkomen dat meerdere studies nodig zijn. Zoals wetenschappelijke studies hebben aangetoond staat een *in vitro* experiment niet gelijk aan een *in vivo* experiment en verloopt de translatie niet altijd zoals gepland. Hierdoor kan het zijn dat de medicijn afgifte *in vivo* afwijkend is van de medicijn afgifte *in vitro*, waardoor de medicijn matrix aangepast dient te worden voor optimale *in vivo* afgifte.

4. *Als er verlies van de coil optreedt, wordt een nieuwe coil vastgehecht aan de conjunctiva. Is de drug concentratie dan nog gelijk in vergelijking met de andere dieren binnen een behandelingsgroep of wordt hiervoor gecorrigeerd?*

Antwoord:

Het kan zijn dat er een grotere dosis medicijn aan het begin van de herplaatsing vrij komt (bulk release). Hiervoor zal in de analyses worden gecorrigeerd.

3.4.4

Appendix 1

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. *Zal de gel aangebracht voor de █████ procedure de drug concentratie beïnvloeden die gevonden wordt in AH sampling? Is het beter om de sequentie om te draaien (eerst AH, daarna █████)?*

Antwoord:

We gaan er vanuit dat de gel de medicijnconcentratie niet beïnvloedt, omdat de viscositeit van de gel hoog genoeg is om niet te leiden tot hoornvliespenetratie. Echter het omdraaien van de procedure kan nadelige gevolgen hebben. Bij het afnemen van AH penetreren we het hoornvlies met een naald. Wanneer we hierna nog een gel aanbrengen is de kans op het induceren van blijvende schade groot omdat de wond niet goed kan dichtten.

2. *Waarom geen AH sampling in het onbehandelde oog?*

Antwoord:

Uit literatuur blijkt dat het konijnoog erg gevoelig is voor ontstekingen wanneer monsters genomen worden en hierna geen ontstekingsremmer gegeven wordt (Radi *et al.* 2008). Wanneer bij het onbehandelde oog AH sampling wordt toegepast, verhogen we de kans op ontstekingen en daarmee het ongerief bij de dieren.

Daarnaast schrijven de richtlijnen van de ARVO voor, dat een bilaterale behandeling van ogen bij proefdieren goed overwogen moet worden, alvorens toegepast, omdat deze dierenleed significant verhogen wanneer complicaties ontstaan.

3. *Om veiligheid van █████ vast te stellen wordt epitheel weefsel weggehaald bij het onbehandelde oog. Kan er een interactie verwacht worden (verlaagde veiligheid) tussen █████ en behandelde oog? Wat is reactie van oog na afname epitheel weefsel bij volgende █████ onderzoek?*

M.a.w. moet er ook geen epitheel weefsel weggehaald worden bij het behandelde oog? Dient er een lege coil (geen drug release) in het onbehandelde oog geplaatst te worden?

Antwoord:

Het afnemen van epitheelcellen door middel van impressie cytologie is een veelgebruikte toepassing binnen de kliniek om de gezondheid van het hoornvlies vast te stellen. Uit literatuur blijkt dat afnemen van epitheelcellen geen reactie geeft op het oog (Dursun *et al.* 2000; Gillan *et al.* 2008; Singh *et al.* 2005). Derhalve verwachten wij dat █████ onderzoek geen additioneel veiligheidsrisico heeft na het afnemen van epitheelcellen.

Epitheelcellen zullen ook afgenomen worden aan het behandelde oog. De tabel in de appendix is hierop aangepast.

Er is bewust voor gekozen om geen placebo oculaire coils mee te nemen in de studie. Aangezien de oculaire coils ontworpen zijn voor humaan gebruik, zijn ze waarschijnlijk aan de grote kant voor konijnen. Hierdoor is de kans op het verliezen van een oculaire coil groter bij konijnen dan bij mensen. Om dit te voorkomen zou, de oculaire coil aan de conjunctiva gehecht moeten worden. Als dit gedaan wordt dienen ontstekingsremmers toegepast te worden om de conjunctiva te behandelen.

Dit resulteert in een vertekend beeld waardoor deze konijnen dan uiteindelijk niet als controle kunnen fungeren wat zou betekenen dat de dieren verspild zijn.

4. *Met welke reden worden dieren tussentijds opgeofferd? Is dit noodzakelijk voor de vraagstelling (andere doelstellingen hebben als eindpunt 4 weken)? M.a.w. kan het met minder dieren?*

Antwoord:

Om te onderzoeken of de ontwikkelde probe voor [REDACTED] geen schade aanricht aan het endotheel van het oog willen we tussentijds histologisch onderzoek verrichten. Afhankelijk van de resultaten wordt tussentijds de [REDACTED] bijgesteld om veiligheid in verdere studies (appendici 2 en 3) te garanderen.

5. *Beschrijf mogelijke redenen van drop-out.*

Antwoord:

Mogelijke redenen tot drop-out kunnen zijn:

- Ontsteking aan het oog, welke ondanks de behandeling met [REDACTED] niet onder controle gebracht kan worden.
- Beschadiging van het oog door interactie tussen de konijnen.
- Ziekte onafhankelijk van de interventie.
- Onvoorziene dood.

B. De Dieren.

6. *Kunnen beide sexen gebruikt worden?*

Antwoord:

Ja. Al willen we ze niet bij elkaar huisvesten omdat we geen zwangere dieren willen.

D. Vervanging, vermindering en verfijning.

7. *Is het verwijderen van de coil afdoende bij optreden van ernstig ongerief?*

Antwoord:

Dit is afhankelijk van de staat van het ongerief. Wanneer de konijnen blijvende schade aan het oog hebben opgelopen dienen de dieren geëuthanaseerd te worden. Wanneer een irriterende conjunctiva is geobserveerd, is verwijdering van de oculaire coil voldoende.

E. Herhaling.

8. *Is er onderzocht of anderen (literatuur) reeds met deze techniek gewerkt hebben in een vergelijkbare studie opzet?*

Antwoord:

[REDACTED]

J. Humane eindpunten.

9. *De humane eindpunten lijken niet in overeenstemming te zijn met de beschrijving onder D. Bij ernstig ongerief in D wordt coil verwijderd, terwijl bij moderate ongerief in J dieren geofferd worden.*

Antwoord:

Dit is aangepast in de betreffende appendix.

Appendix 2

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. *Is een extra groep (vergelijking met eerste generatie coils) nodig of kan eerste versus tweede generatie coils vergeleken worden zodat een druppels niet meer nodig zijn?*

Antwoord:

Zoals reeds hierboven aangegeven is de ‘oude’ oculaire coil niet vergelijkbaar met de ‘nieuwe’ oculaire coil. De ‘oude’ oculaire coil is het start-/uitgangproduct waarop de nieuwe oculaire coil gemaakt is. Door veranderingen in onder andere de coating, diameter, flexibiliteit en medicijn afgifte kan dit gezien worden als een nieuw product.

2. *Wordt er bij aanbrenge van een nieuwe coil rekening gehouden met de concentratie drug?*

Antwoord:

In de analyse achteraf zal hiermee rekening gehouden worden.

3. *Beschrijf mogelijke redenen van drop-out.*

Antwoord:

Mogelijke reden tot drop-out kunnen zijn:

- Ontsteking aan het oog, welke ondanks de behandeling met [REDACTED] niet onder controle gebracht kan worden.
- Beschadiging van het oog door interactie tussen de konijnen.
- Ziekte onafhankelijk van de interventie.
- Onvoorziene dood.

4. *Wat wordt bedoeld met de laatste zin bij A?*

Antwoord:

Met de volgende zin: *“When the results in the first trial are significantly lower compared to the eye drop group, the experiment will be repeated with 9 rabbits (incl. 10% drop outs), after optimization of the ocular coil drug delivery matrix in vitro.”* wordt bedoeld;

Het herhalen van het experiment wanneer blijkt dat de medicijn afgifte matrix *in vivo* een significant lagere hoeveelheid medicijn afgeeft. Om te voorkomen dat een volledig nieuwe aanvraag ingediend moet worden en te zijner tijd meerdere dieren nodig zullen zijn is dit opgenomen in de huidige aanvraag.

B. De Dieren.

5. *Kunnen beide sexen gebruikt worden?*

Antwoord:

Ja. Al willen we ze niet bij elkaar huisvesten omdat we geen zwangere dieren willen.

E. Herhaling.

6. *Is er onderzocht of anderen (literatuur) reeds met deze techniek gewerkt hebben in een vergelijkbare studie opzet?*

Antwoord:

[Redacted answer]

Appendix 3

Vragen:

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters.

1. *Dient de controle groep geen sham behandeling te ondergaan (coil zonder drug, ...)?*

Antwoord:

Er is bewust gekozen om geen placebo oculaire coils mee te nemen in de studie.

Omdat de oculaire coils ontworpen zijn voor humaan gebruik, zijn ze waarschijnlijk aan de grote kant voor konijnen. Hierdoor is de kans op het verliezen van een oculaire coil groter bij konijnen dan bij mensen. Zodoende zou de oculaire coil aan de conjunctiva gehecht moeten worden. Als dit gedaan wordt dienen ontstekingsremmers toegepast te worden om de conjunctiva te behandelen. Dit resulteert in een vertekend beeld waardoor deze konijnen dan uiteindelijk niet als controle kunnen fungeren wat zou betekenen dat de dieren verspilt zijn.

2. *Wordt er bij het aanbrengen van een nieuwe coil rekening gehouden met de concentratie drug?*

Antwoord:

Tijdens de analyse zal hiermee rekening gehouden worden.

3. *Redenen van drop-out?*

Antwoord:

Mogelijke reden tot drop-out kunnen zijn:

- Ontsteking aan het oog, welke ondanks de behandeling met [Redacted] niet onder controle gebracht kan worden.
- Beschadiging van het oog door interactie tussen de konijnen.
- Ziekte onafhankelijk van de interventie.
- Onvoorziene dood.

4. *Waarom is het aantal dieren lager in vergelijking met de vorige appendix. Je verwacht therapeutisch gezien een kleiner verschil tussen de groepen, dus zou het aantal dieren theoretisch hoger moeten liggen?*

Antwoord:

In de experimenten van de tweede appendix wordt gekeken of de intra-oculaire medicijnconcentratie, afgegeven door de oculaire coil, gelijk of hoger is dan de afgegeven medicijnconcentratie door oogdruppels. Wanneer dit zo is, kan (omdat het farmaceutisch actieve component gelijk is in beide toedieningsvormen) geconcludeerd worden dat het effect van het medicijn, afgegeven door de oculaire coil, gelijk is aan dat van de oogdruppels.

Omdat bekend is dat het farmaceutisch actieve component ontstekingen remt bij de concentratie in oogdruppels en in appendix 2 aangetoond is dat dit gelijk of beter is wanneer een oculaire coil gebruikt wordt, kan het aantal proefdieren dat nodig is om bevestigen dat de oculaire coil werkt omlaag in appendix 3.

B. De Dieren.

5. *Kunnen beide sexen gebruikt worden?*

Antwoord:

Ja. Al willen we ze niet bij elkaar huisvesten omdat we geen zwangere dieren willen.

E. Herhaling.

6. *Hoe wordt herhaling vermeden?*

Antwoord:

Herhaling wordt vermeden door te zorgen dat de oculaire coil met de juiste medicijn houdende matrix gebruikt wordt in de derde studie.

J. Humane eindpunten.

7. *De humane eindpunten lijken niet in overeenstemming te zijn met de beschrijving onder D. Bij ernstig ongerief in D wordt coil verwijderd, terwijl bij moderate ongerief in J dieren geofferd worden.*

Antwoord:

De humane eindpunten zijn aangepast in de appendix zodat deze in overeenstemming zijn.

Daarnaast heeft men in alle appendici aangepast dat de dieren in sommige gevallen onder hypnose behandeld zullen worden in plaats van volledige anesthesie.

Hypnose is minder belastend voor de dieren waardoor het ongerief verlaagd word. Verder heeft deze verandering geen effect op de behandelingen die men uitvoert.

- Datum antwoord 22-12-2016
- Verstreckte antwoorden: Zie hierboven.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts: (niet lid van de DEC-UM) *N.V.T.*

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. **JA**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe** aanvraag.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
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.

Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan.

De DEC-UM vertrouwt erop 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-UM 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? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.

N.v.t., daar dit buiten de taakstelling van de DEC valt overeenkomstig artikel 18a.2.b van de Wod.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel.

Het projectvoorstel heeft inderdaad kenmerken van translationeel onderzoek.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen.

Zie antwoord op vraag C5.

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 toegepast wetenschappelijke project dat zich richt op de mogelijkheden van geneesmiddelen toediening in het oog via een van geneesmiddelen voorzien staafje (drug-loaded ocular coil) en een daarop toegesneden niet-invasieve meetmethode () zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de medische wetenschap, toekomstige patiënten en hun naasten en de samenleving als geheel.

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan. Ze zullen ongerief ondervinden dat voornamelijk wordt geclassificeerd als gering. Bij 15% van de dieren wordt het ongerief ingeschat op matig.

Waarden die bevorderd worden voor de proefdieren door de ontwikkeling van de [REDACTED] zijn: *verminderde aantasting van integriteit door niet-invasieve meetmethode. Tevens zullen de proefdieren in het vervolg minder ongerief ondervinden.*

Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: *De onderzoekers zullen medisch-wetenschappelijke kennis verkrijgen en delen met de wetenschappelijke gemeenschap. De onderzoekers vergaren kennis over de mogelijkheden van geneesmiddelen toediening in het oog via een van geneesmiddelen voorzien staafje (drug-loaded ocular coil) en een daarop toegesneden niet-invasieve meetmethode [REDACTED]. Bij een scala aan oogziekten kan dit leiden tot verbeterde therapeutische ingrepen.*

Waarden die voor patiënten bevorderd worden: *Meer kennis over therapeutische mogelijkheden bij diverse oogaandoeningen. Dat kan op termijn de kwaliteit van leven verbeteren van mensen die lijden aan oogziekten en hun naasten.*

Groei van medische kennis op een gebied waar daaraan behoefte is, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. Oogziekten komen veel voor. Daarom heeft dit onderzoek ook belang voor de samenleving als geheel.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wetgeving.

N.v.t., daar dit buiten de taakstelling van de DEC valt overeenkomstig artikel 18a.2.b van de Wod.

Proefopzet en haalbaarheid

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

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat gezien de wetenschappelijke output, de verworven interne- en externe financiering alsmede de aandacht voor de drie V's.

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. Licht uw antwoord toe.

De DEC-UM is er van overtuigd dat het projectvoorstel aansluit bij recente wetenschappelijke inzichten en geen hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten in de weg zullen staan. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder gekozen en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen naar de mening van de DEC-UM leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wod voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw antwoord toe. **N.V.T.**

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan omdat het om wetenschappelijke redenen noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht toe waarom wel/niet.

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat zulks het geval is.

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren.

De DEC-UM vertrouwt erop dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen.

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

De integriteit van de dieren zal worden aangetast door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en de opoffering aan het eind daarvan.

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

Naar de mening van de DEC-UM zijn de humane eindpunten zorgvuldig beschreven en is de inschatting van het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken eveneens zorgvuldig beschreven in de projectaanvraag.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord.

De DEC-UM is van mening dat de doelstellingen van de proef niet behaald kunnen worden, anders dan met de aangevraagde dieren, daar geschikte vervangingsalternatieven ontbreken, zoals beschreven in onderhavig projectvoorstel.

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

Naar de mening van de DEC-UM is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat zulks mede gebaseerd op statistische analyse middels een poweranalyse.

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

De DEC-UM heeft zich ervan verzekerd dat de aanvrager al het mogelijke zal doen om het eventuele ongerief voor de proefdieren te identificeren, te verminderen en waar mogelijk te voorkomen. Hierbij heeft de DEC-UM onder andere de pijnbestrijding en huisvesting in haar beoordeling betrokken.

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. Onderbouw uw antwoord.

Voor zover de DEC-UM kan beoordelen zijn de kennis en kunde van de onderzoeksgroep adequaat en mede gezien het daartoe strekkende antwoord van de aanvrager in de projectaanvraag heeft de DEC-UM reden aan te nemen dat onnodige duplicatie achterwege blijft.

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.

In onderhavige projectaanvraag worden niet dieren van een eenvormig geslacht gebruikt. Alhoewel de DEC-UM vermindering van proefdieren in voorraad gedood toejuicht is zij overigens van mening dat dit aspect met name met de centrale dienst proefdieren en de aanvrager kortgesloten dient te worden daar de DEC niet betrokken is bij de fok en aankoop van proefdieren.

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

Naar de mening van de DEC-UM is dit genoegzaam beschreven in de projectaanvraag door de aanvrager.

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

Adoptie is ten aanzien van onderhavige aanvraag niet opportuun daar het hier niet handelt om niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren.

NTS

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

Naar de mening van de DEC-UM is zulks het geval.

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag.

Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over de mogelijkheden van geneesmiddelen toediening in het oog via een van geneesmiddelen voorzien staafje (drug-loaded ocular coil) en een daarop toegesneden niet-invasieve meetmethode (), de opoffering en het milde en soms matige ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het

voorliggende project "*Evaluation of a drug-loaded ocular coil for sustained drug delivery to the eye?*"

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.

Waarden die voor de betrokken proefdieren in het geding zijn: *gering tot matig nadeel*.

Waarden die voor toekomstige proefdieren in het geding zijn: *gering voordeel*.

Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: *substantieel voordeel*.

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: *matig voordeel*.

Algemeen: *relevante groei van therapeutische mogelijkheden in oogheelkunde*.

De DEC-UM is van mening dat de belangen van de onderzoekers en de biomedische wetenschap, van patiënten en hun naasten en van toekomstige proefdieren binnen het project "*Evaluation of a drug-loaded ocular coil for sustained drug delivery to the eye?*" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven na mild en soms matig ongerief tot de dood. Zij worden door de proeven in hun welzijn geschaad. De integriteit van de dieren wordt in dit project geschaad door de experimentele handelingen en het leven met de gevolgen daarvan gedurende de proeven en het opofferen aan het eind van de proeven.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot meer kennis over de mogelijkheden van geneesmiddelen toediening in het oog via een van geneesmiddelen voorzien staafje (drug-loaded ocular coil) en een daarop toegesneden niet-invasieve meetmethode (). Bij een scala aan oogziekten kan dit leiden tot verbeterde therapeutische ingrepen. Dat kan op termijn de kwaliteit van leven verbeteren van mensen die lijden aan oogziekten en hun naasten.

Groei van medische kennis op een gebied waar daaraan behoefte is, wordt eveneens bevorderd door het onderhavige onderzoek. Oogziekten komen veel voor. Daarom heeft dit onderzoek ook belang voor de samenleving als geheel. Vandaar dat de DEC-UM het onderhavige onderzoek van substantieel belang acht.

Het is aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het lijden van de dieren te beperken d.m.v. pijnbestrijding, waardoor het werkelijke ongerief van de dieren beperkt blijft in relatie tot het te behalen voordeel.

3. Beantwoord de centrale morele vraag.

De DEC-UM beantwoordt de centrale morele vraag: "Rechtvaardigt het verkrijgen van kennis over de mogelijkheden van geneesmiddelen toediening in het oog via een van geneesmiddelen voorzien staafje (drug-loaded ocular coil) en een daarop toegesneden niet-invasieve meetmethode (), de opoffering en het milde en soms matige ongerief dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project "*Evaluation of a drug-loaded ocular coil for sustained drug delivery to the eye?*" bevestigend.

Hoewel de DEC-UM de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergane ongerief van de proefdieren, weegt het substantiële belang van dit project naar haar mening zwaarder.

De DEC-UM is van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en de uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschikken ruimschoots over de benodigde kennis en technische expertise. Er is geen sprake van duplicatie. In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoet gekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. De DEC-UM is er van overtuigd dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren als het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. Er zijn voldoende go/no go momenten voorzien om onnodige dierproeven te vermijden.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Maastricht
[REDACTED]
Postbus 616
6200 MD MAASTRICHT

**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD107002017829

Uw referentie
uw ref

Bijlagen
1

Datum **23 MRT 2017**
Betreft **Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven**

Geachte [REDACTED]

Op 19 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Evaluation of adrug-loaded ocular coil for sustained drug delivery to the eye" met aanvraagnummer AVD107002017829. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 7 maart 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Er zijn u vragen gesteld om uw aanvraag op bepaalde punten te verduidelijken. U heeft de vragen beantwoord en de documenten van uw projectaanvraag aangepast en opnieuw ingediend.

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 "Evaluation of adrug-loaded ocular coil for sustained drug delivery to the eye" starten, met de in de vergunning genoemde dierproeven. De vergunning wordt afgegeven van 24 maart 2017 tot en met 24 maart 2019. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat wij in overleg met u een kortere looptijd zijn overeengekomen welke meer proportioneel is voor het aantal aangevraagde dierproeven.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-UM gevoegd. Dit advies is opgesteld op 19 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 geheel over aangevuld met algemene voorwaarden.

Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan 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 gegevens 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).

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

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 Maastricht
Adres: Postbus 616
Postcode en woonplaats: 6200 MD Maastricht
Deelnemersnummer: 10700

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 maart 2017 tot en met 24 maart 2019, voor het project "Evaluation of adrug-loaded ocular coil for sustained drug delivery to the eye" met aanvraagnummer AVD107002017829, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-UM.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 19 januari 2017
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 7 maart 2017;
 - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 7 maart 2017;
 - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 19 januari 2017, ontvangen op 19 januari 2017
 - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 7 maart 2017.

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1 [REDACTED] proof-of-concept study	Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) / volwassen dieren	23	licht
3.4.4.2 Ocular pharmacokinetics study	Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) / volwassen dieren	45	matig
3.4.4.3 Ocular efficacy study	Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) / volwassen dieren	24	Licht/matig

Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen. De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele 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 overleg met de IvD te

Datum

23 maart 2017

Onze referentieAanvraagnummer
AVD107002017829

melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

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

In artikel 13d 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.

[<indien ontheffing aanwezig artikel 13c>](#)

De Minister heeft [<vrijstelling of 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.

[<indien locatie niet van een gebruiker is>](#)

Locatie

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

[<indien hond, kat of niet-menselijke primate>](#)

Levensloopp dossier

Voor iedere hond, kat en niet-menselijke primate moet volgens artikel 15a van de wet een levensloopp dossier bijgehouden worden.

[<indien ontheffing aanwezig artikel 10e lid 7>](#)

Niet-menselijke primaten

De Minister heeft een ontheffing verleend volgens artikel 10e lid 7, die het gebruik van niet-menselijke primaten toestaat voor een periode van maximaal vijf jaar.

[<indien wilde dieren>](#)

Wilde dieren

Het vangen van wilde dieren moet volgens artikel 10f van de wet door een deskundig persoon gedaan worden waarbij dieren zo min mogelijk pijn, lijden, angst of blijvende schade ondervinden. Gewonde dieren moeten onderzocht worden en behandeld, tenzij er een wetenschappelijke motivering is om niet te behandelen.

[<indien beoordeling achteraf>](#)

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. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij [<niet-menselijke primaten worden gebruikt>](#) [<die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet>](#) en wordt daarom voorzien van een beoordeling achteraf.

Deze beoordeling zal uiterlijk [<maand + jaar>](#) 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 van de dierproeven conform de vergunning waren.