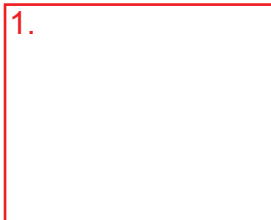


| Inventaris Wob-verzoek W17-08 | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|------------------------------------|----------------|-----------------|--------|-------|--------|-------------------|--------|------|--|
| | | | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | |
| nr. | document NTS 2017836 | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 | |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | x | | |
| 2 | NTS | x | | | | | | | | |
| 3 | Projectvoorstel | | | | x | x | x | x | | |
| 4 | Bijlage beschrijving dierproeven 1 | | | | x | x | x | x | | |
| 5 | Bijlage beschrijving dierproeven 2 | | | | x | x | x | x | | |
| 6 | Ontvangstbevestiging en factuur | | | | x | | x | x | | |
| 7 | DEC-Advies | | | | x | x | x | x | | |
| 8 | Advies CCD | | x | | | | | | x | |
| 9 | 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.zbo-ccd.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 426 <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>Gezondheidsdienst voor Dieren BV</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>8 1 1 7 6 3 6</td></tr></table> | Naam instelling of organisatie | Gezondheidsdienst voor Dieren BV | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [REDACTED] | KvK-nummer | 8 1 1 7 6 3 6 | | | | | | | | | |
| Naam instelling of organisatie | Gezondheidsdienst voor Dieren BV | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [REDACTED] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| KvK-nummer | 8 1 1 7 6 3 6 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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>Arnsbergstraat 7</td></tr><tr><td>Postbus</td><td>Postbus 9</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>7400AA Deventer</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL79ANBA0108807045</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Gezondheidsdienst voor Dieren BV</td></tr></table> | Straat en huisnummer | Arnsbergstraat 7 | Postbus | Postbus 9 | Postcode en plaats | 7400AA Deventer | IBAN | NL79ANBA0108807045 | Tenaamstelling van het rekeningnummer | Gezondheidsdienst voor Dieren BV | | | | | |
| Straat en huisnummer | Arnsbergstraat 7 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Postbus | Postbus 9 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Postcode en plaats | 7400AA Deventer | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IBAN | NL79ANBA0108807045 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer | Gezondheidsdienst voor Dieren BV | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker. | <table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table> | (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | Functie | [REDACTED] | | Afdeling | [REDACTED] | | Telefoonnummer | [REDACTED] | | E-mailadres | [REDACTED] | |
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | | | | | | | | | | | | | | | |
| Functie | [REDACTED] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Afdeling | [REDACTED] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Telefoonnummer | [REDACTED] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E-mailadres | [REDACTED] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.5 | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker. | <table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table> | (Titel) Naam en voorletters | | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | Functie | | | Afdeling | | | Telefoonnummer | | | E-mailadres | | |
| (Titel) Naam en voorletters | | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | | | | | | | | | | | | | | | |
| Functie | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Afdeling | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Telefoonnummer | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| E-mailadres | | | | | | | | | | | | | | | | | |

4 Betaalgegevens

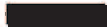
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.287,00 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

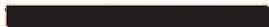
5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
 Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
 Bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.2; advies van de DEC.

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 1.6). 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.

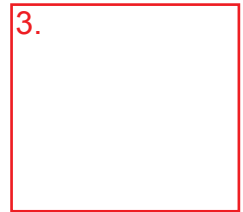
Naam 

Functie 

Plaats Deventer

Datum 01 - 03 - 2017

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 deelnemersnummer van de NVWA in. **426**
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. **De Gezondheidsdienst voor Dieren BV**
- 1.3 Vul de titel van het project in. **Bepaling van de interferentie van een geïnactiveerd vaccin met de werkzaamheid van levend vaccin gericht tegen pokkendifterie en trilziekte bij pluimvee.**

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.

Trilziekte en pokkendifterie zijn virale infecties bij pluimvee. Coryza is een bacteriele ziekte. Tegen alle drie infectieziekten kan gevaccineerd kan worden. Voor trilziekte en pokkendifterie bestaan levende vaccins en voor Coryza geïnactiveerde vaccins. [REDACTED]

[REDACTED]. Het Coryza vaccin is een olie-emulsie-vaccin dat gebruikt wordt bij leghennen en ouderdieren en wordt per injectie subcutaan toegediend. De reden om het levende vaccin toe te voegen aan het geïnactiveerde vaccin is om de dieren in één handeling te kunnen vaccineren in plaats van meerdere. Het levende vaccin wordt hierbij, nadat het is klaargemaakt, gemengd met het geïnactiveerde vaccin. Zowel het levende AE-PD vaccin als het geïnactiveerde vaccin kunnen op dezelfde leeftijd van het dier worden toegediend. Om interferentie van het geïnactiveerde Coryza vaccin op de werkzaamheid van het levende vaccin uit te sluiten, moet de werkzaamheid van het levende AE-PD vaccin worden onderzocht. De werkzaamheid van het pokken virus in het AE-PD vaccin wordt onderzocht in een diermodel, waarbij gevaccineerde dieren worden gechallengeerd met pokken virus, omdat de serologische respons tegen het pokkenvirusvaccin slecht te meten is en weinig verband houdt met de opgewekte bescherming (de bescherming tegen pokkenvirus is vooral T-cel gemedieerd). De werkzaamheid van de AE-component van het AE-PD vaccin wordt serologisch gevolgd, omdat dit vaccinvirus na een succesvolle toepassing een duidelijke antistofrespons opwekt die kwantificeerbaar is en er een goede correlatie is tussen de humorale respons en de mate van bescherming.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

De werkzaamheid van het pokken vaccin moet in een diermodel worden vastgesteld, waarbij gevaccineerde en niet-gevaccineerde dieren worden blootgesteld aan pokkenvirus. Er zijn een aantal voor het projectdoel relevante pokkenvirusstammen beschikbaar, die recent zijn geïsoleerd uit gebieden waar de vaccins toegepast gaan worden. Het pathogene vermogen van deze stammen is echter nog niet onderzocht in dieren. Deze karakterisering is echter noodzakelijk, zodat de betreffende pokkenvirusstam kan worden toegepast in het diermodel om de werkzaamheid van de PD component van het levende AE-PD vaccin te bepalen.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

De doelen van dit project zijn:

- Karakterisering van relevante pokkenvirusstammen voor gebruik in een diermodel om de werkzaamheid van de PD component van een levend AE-PD vaccin te onderzoeken.
- Interferentie van het geïnactiveerde Coryzavaccin met de werkzaamheid van het levende AE-PD vaccin uit te sluiten.

Het instituut waar dit project wordt uitgevoerd heeft zeer veel ervaring met het uitvoeren van dit type experimenteel onderzoek bij pluimvee, het houden en verzorgen van pluimvee, en met de 3 beschreven ziekten (pokken, trilziekte en Coryza).

3.3 Belang

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

Aviaire encephalomyelitis (AE) virus (trilziektevirus) is een virus dat bij jonge kippen tot enkele maanden leeftijd hersenontsteking kan veroorzaken, waarbij veel sterfte op kan treden. Infecties op oudere leeftijd

bij onbeschermd leggende hennen geven een sterke productiedaling zonder verdere ziekteverschijnselen, waarna de hennen doorgaans goed herstellen. Wanneer onbeschermd leggende moederdieren besmet raken zal gedurende 3 tot 9 weken hoge sterfte bij de kuikens optreden omdat het AE-virus via de eieren doorgegeven wordt aan de nakomelingen. Vanwege de sterke productiedaling en hoge uitval bij nakomelingen worden alle leghennen en ouderdieren in de bedrijfsmatige pluimveehouderij in de opfokperiode (0-18 weken leeftijd) met een levend vaccin gevaccineerd tegen AE. Een goed aangeslagen vaccinatie geeft een langdurige, hoge bescherming tegen de infecties. Het vaccin kan via het drinkwater toegediend worden maar een individuele toepassing (oraal, intracutaan of subcutaan) wordt aangeraden omdat deze individuele toepassing betrouwbaarder is.

Fowl Pokken Difterie-virus (PD) is een pokkenvirus dat bij kippen en kalkoenen voorkomt en daar grote schade en welzijnsproblemen kan veroorzaken. Er zijn twee hoofdvormen van de ziekte. Welke vorm het dier laat zien wordt met name veroorzaakt door de infectieplaats. De meest voorkomende vorm van de ziekte is de huidvorm. Deze wordt gekenmerkt door pokkenlaesies op de kam, lellen, oogleden en andere niet-bevederde huiddelen, waarbij de dieren doorgaans weinig algemene ziekteverschijnselen vertonen en binnen 3 tot 4 weken volledig herstellen. Deze vorm is het resultaat van een infectie via kleine huidwondjes of stekende insecten/mijten. De minder frequent voorkomende vorm is de difterische vorm, die gekenmerkt wordt door ontstekingen in de slijmvliezen van de mondholte, slokdarm en luchtpijp. Bij deze vorm speelt een respiratoire infectieroute een hoofdrol. Deze difterische vorm veroorzaakt de ernstigste kliniek en kan tot hoge sterfte lijden door de ernstige pokkenvorming in de mond, keel en luchtwegen. Vanwege de ernstige ziekte die het pokkenvirus kan veroorzaken worden alle leghennen en ouderdieren in de bedrijfsmatige houderij tegen deze ziekte gevaccineerd.

Het levende pokkenvaccin (PD-vaccin) moet subcutaan en/of intracutaan toegediend worden waarbij doorgaans de wingweb-methode gebruikt wordt. Hierbij wordt het vaccin met een gevorkt dubbel naaldje door het vleugelvlies van één vleugel geprikt. Deze vaccinatiemethode is ook geschikt voor het aviaire encephalitis (AE- of trilziektevirus)-vaccin, vandaar dat gecombineerde levend AE-PD-vaccins beschikbaar zijn, waardoor het dier maar voor één handeling en vaccinatie gevangen hoeft te worden in plaats van twee keer. Dit is minder belastend voor het dier en werkt kostenbesparend voor de pluimveehouders.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Dit project bestaat uit 2 onderdelen, die achtereenvolgens in de tijd zullen worden uitgevoerd:

1. Karakterisering van een recent geïsoleerde pokkenvirusstam in kippen.
2. Bepaling van de interferentie van een geïnactiveerd vaccin op de werkzaamheid van een levend AE-PD vaccin.

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

1. De karakterisatie van het pokkenvirus wordt uitgevoerd door SPF-kippen met een leeftijd van minimaal 21 dagen te infecteren met een pokkenvirus en daarna gedurende 21 dagen te vervolgen. De infectie vindt plaats via beschadiging van de huid [REDACTED]
[REDACTED] Deze manier van infecteren is een natuurlijke infectieroute voor het pokken virus. De uitleesparameters van de karakterisatie zijn het ontstaan van pokken of andere huidveranderingen, kliniek gerelateerd aan pokkenvirus.
2. De bepaling van de interferentie van een geïnactiveerd vaccin op de werkzaamheid van een levend AE-PD vaccin wordt onderzocht door een groep kippen van 21 dagen leeftijd te inoculeren met A) een mengsel van het geïnactiveerde vaccin en het levende vaccin en B) het levende vaccin. Drie weken na vaccinatie worden de dieren geïnfecteerd met pokkenvirus. Na deze infectie worden de dieren 3

weken lang geobserveerd. De werkzaamheid van het pokkenvirus wordt onderzocht door te kijken naar huidveranderingen en klinische afwijkingen die te wijten zijn aan pokkenvirus. De werkzaamheid van het AE vaccin virus wordt bepaald door te kijken naar antilichaamtiteren. De resultaten van de gevaccineerde groepen worden onderling vergeleken om interferentie aan te tonen. Daarnaast worden de resultaten van de gevaccineerde groepen vergeleken met de resultaten van ongevaccineerde dieren om de validiteit van de studie vast te kunnen stellen.

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 karakterisering van recent uit West-Europa geïsoleerde pokkenvirusstammen (bijlage 3.4.4.1) wordt eerst uitgevoerd. Elke kandidaat stam wordt separaat getest, middels in de tijd op elkaar volgende dierproeven. Wanneer de eerste stam voldoet aan de gestelde criteria wordt de tweede stam niet meer gekarakteriseerd. Karakterisering van de stammen is noodzakelijk om over een geschikte kandidaat te beschikken die gebruikt kan worden om de werkzaamheid van de PD component van het levende vaccin te onderzoeken. Als een geschikte kandidaat is gevonden, dan is deze fase afgerond en start het tweede deel (bijlage 3.4.4.2) van het project. Als na 2 pogingen geen geschikte kandidaat is gevonden (bijlage 3.4.4.1), dan stopt het project (de studie beschreven in bijlage 2 wordt dan ook niet uitgevoerd).

De resultaten en conclusies van de dierproef beschreven in bijlage 3.4.4.1. worden voorgelegd aan de IvD. De IvD beslist of:

- karakterisatie van de tweede kandidaatstam noodzakelijk is;
- uitvoering van de dierproef zoals beschreven in bijlage 3.4.4.2. mag worden uitgevoerd.

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | De karakterisering van een recent uit West-Europa geïsoleerde pokkenvirusstam |
| 2 | Bepaling van de interferentie van een geïnactiveerd Coryza vaccin met de werkzaamheid van een levend vaccin tegen pokkendifterie en trilziekte bij pluimvee. |
| 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 deelnemersnummer van de NVWA in. | 426 | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------------|---------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Gezondheidsdienst voor Dieren BV | | | | |
| 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | <table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>3.4.4.1</td><td>De karakterisering van een recent uit West-Europa geïsoleerde pokkenvirusstam</td></tr></tbody></table> | Volgnummer | Type dierproef | 3.4.4.1 | De karakterisering van een recent uit West-Europa geïsoleerde pokkenvirusstam |
| Volgnummer | Type dierproef | | | | |
| 3.4.4.1 | De karakterisering van een recent uit West-Europa geïsoleerde pokkenvirusstam | | | | |

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Fowl Pokken Difterie-virus (PD) is een pokkenvirus dat bij kippen en kalkoenen voorkomt en daar grote schade en welzijnsproblemen kan veroorzaken. Vanwege de ernstige ziekte die het pokkenvirus kan veroorzaken worden alle leghennen en ouderdieren in de bedrijfsmatige pluimveehouderij tegen deze ziekte gevaccineerd. In dit project wordt de werkzaamheid van een vaccin tegen pokkendifterie onderzocht. Hiervoor is een recent geïsoleerde veldstam nodig die voldoende is gekarakteriseerd. In deze dierstudie wordt het ziekmakend vermogen van een of twee recentelijk uit het veld geïsoleerd pokkenvirussen van West Europese herkomst onderzocht, zodat de stam gebruikt kan worden als challenge materiaal om de werkzaamheid van een PD vaccin te onderzoeken. Hiertoe worden – per veldstam - 10 kuikens van minimaal 21 en maximaal 42 dagen leeftijd [redacted] geïnoculeerd met het pokken virus. Dit zijn natuurlijke infectieroutes waarmee kippen zijn te besmetten met pokken virus. De dosering pokken virus per kip is [redacted] en is gebaseerd op in de literatuur beschreven onderzoek. Vanaf het moment van inoculatie (D0) tot het einde van de proef (D20) worden de dieren dagelijks geobserveerd op het voorkomen van huidveranderingen ('pokjes') op de inoculatieplek en op andere klinische verschijnselen. Op de laatste dag worden de dieren geëuthanaseerd en postmortaal onderzocht op de aanwezigheid van afwijkingen die veroorzaakt zijn door het pokken virus (Tabel 1).

van antilichamen tegen het pokken virus en het pokkenvirus zelf.

Als de eerste virus stam is getest, wordt de conclusie gedeeld met de IvD. Mocht een nieuwe dierstudie nodig zijn waarbij de tweede stam wordt getest, dan wordt hiervoor toestemming gevraagd aan de IvD. Ook de conclusie van deze tweede studie wordt gedeeld met de IvD. De IvD beslist of de dierproef in bijlage 3.4.4.2. mag worden uitgevoerd en welke van de 2 stammen hierbij gebruikt zal worden.

B. De dieren

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

- In deze dierstudie worden niet genetisch gemodificeerde SPF-legkippen gebruikt. Kippen zijn het doeldier van het pokken virus.
- De dieren zijn afkomstig van niet-geregistreerde fokbedrijven.
- SPF-pluimvee: deze dieren zijn onder andere vrij van maternale antilichamen tegen pokken (Fowl Pox) en zijn niet eerder met een pokkenvirus in aanraking zijn geweest wat de resultaten van de proef zou vertroebelen.
- Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden gebruikt: er is geen verschil in gevoeligheid voor het aanslaan van infectie tussen mannelijke en vrouwelijke dieren.
- De leeftijd waarop de dieren geïncubeerd worden in de studie is minimaal 21 en maximaal 42 dagen. Dieren van alle leeftijden zijn gevoelig voor het ontwikkelen van klinische verschijnselen van pokken. De EP monografie schrijft een challenge leeftijd van 42 dagen voor. De dieren bereiken maximaal de leeftijd van 62 dagen.
- In deze dierproef worden maximaal 40 dieren gebruikt (10 dieren per virus stam, eventueel herhaling bij invaliditeit van de studie en 2 te onderzoeken virus stammen).

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

Vervanging is niet mogelijk, omdat de bepaling van het ziekmakend vermogen van een virusstam in het doeldier uitgevoerd dient te worden. Vervangende methoden door middel van celweek, weefselweek of moleculaire testen zijn niet bruikbaar, omdat bij dit soort in vitro-methoden de interactie tussen gastheer-immuniteit en gastheer-omgeving niet kan worden nagebootst. De informatie uit deze dierproef is nodig voor het uitvoeren van werkzaamheidsstudies van pokken virus vaccins.

Vermindering

- Het aantal dieren is voorgeschreven door de Europese Farmacopoea monografie voor pokken vaccins (Fowl-Pox vaccine 04/2013:0649). Deze richtlijn wordt internationaal als leidend gezien. Vermindering van het aantal dieren tot minder dan 10 dieren per virusstam is niet wenselijk, omdat hiermee de werkzaamheid van het vaccin en de validiteit van de dierproef beschreven in bijlage 3.4.4.2. niet goed kan worden ingeschat.
- Aan het eind van de studie worden de dieren geëuthanaseerd en wordt het bloed van de dieren opgevangen, zodat het kan worden gebruikt als controle serum voor de ontwikkeling en productie van diagnostische testen, zodat hiervoor minder dierproeven voor uitgevoerd hoeven te worden.

Verfijning

- Het model is op twee niveaus verfijnd ten opzichte van de klassieke modellen. [REDACTED]

eerstgenoemde challenge-manieren naast de huidvorm ook de difterievorm opwekken en dat geeft een grotere welzijnsaantasting (tot sterfte toe).

- Er zijn 2 pokken virusstammen beschikbaar die getest kunnen worden. In deze dierproef wordt eerst één pokken virus getest. Als dit virus niet het beoogde resultaat oplevert, dan wordt de tweede stam getest. Van beide pokken virus stammen is bekend dat ze in het veld een ziektebeeld vertoonden en bij aanvullende onderzoek (post mortaal en histologisch) een beeld van pokkendifterie veroorzaakten dat pathogener is dan een vaccin op zou kunnen wekken. Daarnaast hebben beide virus stammen een sterke positieve serologie opgewekt voor antistoffen tegen reticuloendotheliose-virus (REV), zonder dat er sprake was van een REV infectie. Het is bekend dat pokken difterie stammen die inserts hebben van genen van REV een grotere kans hebben dat ze pathogeen zijn. De kans dat het huidige isolaat niet voldoet lijkt daarom klein.
- Mochten de pokken virus stammen die in deze dierproef zijn onderzocht niet voldoen aan de criteria gesteld in de monografie over pokken vaccins, dan kan kunnen de resultaten wel gebruikt worden om de werkzaamheid van een pokken vaccin door middel van statistische toetsing tussen niet-gevaccineerde en gevaccineerde gechallengde dieren aan te tonen.

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.

Pijn en angst als gevolg van het verrichten van (biotechnische) handelingen zijn inherent aan het uitvoeren van de studie, maar deze handelingen zullen door bevoegd en bekwaam personeel worden verricht. Lijden als gevolg van ziekte zal tot een minimum worden beperkt, omdat als verwacht wordt dat humane eindpunten bereikt zullen worden, het desbetreffende dier geëuthanaseerd wordt. Verder is het model gebaseerd op het opwekken van huidlaesies en niet op de ernstigere difterievorm van de ziekte.

Geëuthanaseerde dieren, resten van onderzochte dieren en mest zullen volgens geldende regels worden afgevoerd, zodat relevante milieueffecten niet zijn te verwachten.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Een dierproef met de 2 kandidaten zoals wij die willen uitvoeren is nergens ter wereld gedaan. De 2 virus stammen die wij in ons bezit hebben zijn uniek.

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.

Elke groep van maximaal 11 dieren wordt gehuisvest in een verblijf (isolator) met een oppervlakte van 1.44 m². Dit is kleiner dan de minimale omvang van de leefruimte van 2 m² zoals genoemd in bijlage III van de richtlijn.

De hoogste leeftijd die de dieren in deze dierproef bereiken is 9 weken, waarbij het lichaamsgewicht op dat moment schommelt tussen 700 en 800 gram. In bijlage III van de richtlijn wordt voor dit type dier met dit gewicht als minimale oppervlakte 900 cm² genoemd, wat aangehouden wordt in deze dierstudie.

Gedurende de 10 jaar dat GD isolatoren gebruikt zijn er geen klinische afwijkingen gezien die te wijten waren aan de huisvesting. Het gebruik van isolatoren maakt het mogelijk om de dieren nauwkeurig en op ooghoogte te inspecteren en handelingen te verrichten. Daarnaast kan het klimaat van elke isolator nauwkeurig worden gestuurd. De dieren krijgen onbeperkt beschikking over water en voer. Wij concluderen dat het huisvesten van kippen in isolatoren niet nadelig is voor het welzijn van de dieren.

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.

Pijnverlichting (en ontstekingsremming) interfereert met de uitkomstparameters van deze dierstudie en is daarom gecontra-indiceerd. [REDACTED]

Met de gebruikte challengemethode worden alleen huidpokken verwacht waarvan onder praktijkomstandigheden blijkt dat de dieren er doorgaans weinig last van lijken te hebben.

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?

- Op een leeftijd van maximaal 10 dagen wordt elk kuiken gesnavelkapt om problemen als gevolg van kannibalisme (dat incidenteel optreedt) bij het ouder worden van het dier te voorkomen. Snavelkappen gaat gepaard met pijn gedurende de handeling zelf en gedurende enkele dagen als onbedoeld het kappen technisch niet helemaal goed is uitgevoerd door beweging van de snavel van het dier.
- Stress door:
 - Transport van dieren van hun bekende verblijf naar de eindbestemming wat ongeveer 15-20 minuten zal duren.
 - Fixatie van het dier voor het uitvoeren van de nodige handelingen (vaccinatie, challenge en controles).
 - Inductie van de verdoving door inhalatie van een O₂-CO₂-gasmengsel (toenemende concentratie CO₂) ten tijde van euthanasie.
- [REDACTED]
- Eventuele optredende ziekteverschijnselen als gevolg van het aanslaan van het pokken virus, bestaande uit:
 - Aspecifieke verschijnselen: opgezette veren; verminderde alertheid.
 - Specifiekere verschijnselen:
 - Pokkenlaesies op de huid [REDACTED] die als ze niet bacterieel worden gecontamineerd niet leiden tot ongerief;
 - Difterielaesies op de membranen van de mondholte, slokdarm of luchtpijp. Bij uitgebreid voorkomen kunnen deze laesies leiden tot ongerief.
- Onthouden van voer gedurende 2 uur na de donkerperiode voor het euthanaseren op D20 (onthouden van voer is noodzakelijk om het risico van contaminatie van het tijdens de euthanasie opgevangen bloed met inhoud van de krop te verminderen).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- De bovengenoemde vormen van welzijnsaantasting zijn inherent aan het uitvoeren van (biotechnische) handelingen in deze studie.
- De klinische verschijnselen die kunnen optreden zijn een gevolg van het aanslaan van het pokkenvirus.

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

te minimaliseren.

- Vermindering van de ernst van deze effecten wordt bereikt doordat handelingen tot een minimum beperkt worden en alleen worden uitgevoerd door ervaren, getraind en bekwaam personeel.
- Het risico dat klinische verschijnselen zullen optreden wordt beperkt door een wijze van toedienen van pokken virus te gebruiken die lokaal blijft en hoogstwaarschijnlijk niet systemisch wordt.
- Het onthouden van voer zal zoveel mogelijk aansluitend aan de 8 uur donkerperiode van de dieren plaats vinden. Het licht in de isolator blijft uit totdat de dieren naar de eindbestemming gaan.

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.

De volgende humane eindpunten worden gehanteerd:

Een dier wordt uit de studie gehaald bij een combinatie van bol zitten (met een ruw verenkleed) en één of meer van de volgende verschijnselen:

- het niet meer kunnen vertonen van natuurlijke gedrag gedurende 24 uur;
- niet meer zelfstandig kunnen lopen, staan, eten of drinken.
- met open mond ademen en geforceerd ademen (af te lezen aan bewegingen van de buikholte), hetgeen wijst op aantasting van de bovenste luchtweg bij kippen door het pokken virus.

Bovenbeschreven humane eindpunten zijn gemakkelijk herkenbaar door het personeel dat de dieren verzorgt.

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

Op basis van de literatuur en ervaring in het veld met huidpokken is de verwachting dat geen van de dieren dit zal bereiken

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.

40: matig 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.

Op het einde van de dierstudie (D20) worden de dieren geëuthanaseerd, omdat op de dieren pathologisch onderzoek moet worden verricht.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

| 1.1 Vul uw deelnemersnummer van de NVWA in. | 426 | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------------|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Gezondheidsdienst voor Dieren BV | | | | |
| 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | <table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>3.4.4.2</td><td>Bepaling van de interferentie van een geïnactiveerd Coryza vaccin met de werkzaamheid van een levend vaccin tegen pokkendifterie en trilziekte bij pluimvee.</td></tr></tbody></table> | Volgnummer | Type dierproef | 3.4.4.2 | Bepaling van de interferentie van een geïnactiveerd Coryza vaccin met de werkzaamheid van een levend vaccin tegen pokkendifterie en trilziekte bij pluimvee. |
| Volgnummer | Type dierproef | | | | |
| 3.4.4.2 | Bepaling van de interferentie van een geïnactiveerd Coryza vaccin met de werkzaamheid van een levend vaccin tegen pokkendifterie en trilziekte bij pluimvee. | | | | |

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Aviaire encephalomyelitis (AE) virus (trilziekte virus) is een virus dat bij jonge kippen hersenontsteking kan veroorzaken waarbij veel sterfte op kan treden. Infecties op oudere leeftijd bij onbeschermd leggende hennen geven een sterke productiedaling. Het Fowl Pokken Difterie virus (PD) is een pokkenvirus dat wereldwijd bij kippen en kalkoenen voorkomt en grote welzijnsproblemen en economische schade kan veroorzaken. Vanwege de ernstige ziekte die beide virussen kunnen veroorzaken worden alle leghennen en ouderdieren in de bedrijfsmatige pluimveehouderij tegen deze ziekte gevaccineerd. Het levende pokkenvaccin (PD vaccin) moet intracutaan toegediend worden, waarbij doorgaans de wingweb methode gebruikt wordt. Hierbij wordt het vaccin met een gevorkt naaldje door de huidplooi van een vleugel geprikt. Deze vaccinatiemethode is ook geschikt voor het aviaire encephalitis virus (AE of trilziekte virus) vaccin vandaar dat er diverse farmaceuten een gecombineerd levend AE-PD vaccin hebben, zodat vaccinatie in één handeling uitgevoerd kan worden hetgeen welzijnsvriendelijker is en kostenbesparend.

In deze dierproef wordt de werkzaamheid van een levend vaccin voor pluimvee tegen trilziekte en pokken onderzocht, wanneer dit toegevoegd wordt aan een geïnactiveerd vaccin voor pluimvee tegen de ziekte Coryza. Dit geïnactiveerde vaccin is een olie-emulsievaccin dat gebruikt wordt bij leghennen en ouderdieren om de weerstand tegen *Avibacterium paragallinarum* (Coryza) op te wekken. Daartoe worden SPF-leg kippen met een leeftijd van minimaal 21 dagen gebruikt. Met het gebruik van SPF-kippen kan men een versturende invloed van de maternale immuniteit en eventuele verticale infecties (trilziektevirus kan via het ei meegegeven worden) uitsluiten. De bescherming tegen het pokkenvirus wordt onderzocht met een model waarbij gevaccineerde en niet-gevaccineerde kippen worden blootgesteld aan pathogeen pokkenvirus. De serologische respons tegen het pokkenvirusvaccin is slecht te meten en er is weinig verband tussen serologische respons en bescherming (de bescherming tegen pokkenvirus is vooral T-cel gemedieerd).

De respons op de AE component van het vaccin wordt serologisch gevolgd omdat dit vaccin na een succesvolle toepassing een duidelijke antistofrespons opwekt (meetbaar en kwantificeerbaar met de ELISA) en er een goede correlatie is tussen de humorale respons en de bescherming. Hierdoor kan voor deze studie een AE-challenge vermeden worden. In deze studie wordt alleen de interferentie van het geïnactiveerde vaccin op het levende vaccin onderzocht.

De dieren worden ad random verdeeld over vier behandelingsgroepen:

- Behandelingsgroep 1 (23 dieren): vaccinatie met het te onderzoeken levende AE-PD vaccin toegevoegd aan een geïnactiveerd Coryza-vaccin, gevolgd door challenge met een pokkenvirus. Deze groep dient om interferentie van het Coryza-vaccin op de werkzaamheid van het AE-PD vaccin aan te tonen.
- Behandelingsgroep 2 (23 dieren): vaccinatie met het levende AE-PD vaccin, gevolgd door challenge met een pokkenvirus. Deze groep dient om de werkzaamheid van het AE-PD vaccin aan te tonen.
- Behandelingsgroep 3 (13 dieren): niet gevaccineerd, maar blootgesteld aan pokkenvirus. Deze groep dient om de challenge met pokkenvirus te bepalen en daarmee de dierproef te valideren.
- Behandelingsgroep 4 (7 dieren): niet gevaccineerd, maar geïnoculeerd met een mock. Deze groep dient ter controle van de afwezigheid van antistoffen tegen AE en pokken en pokkenontwikkeling en bepaald ook de validiteit van een studie.

De dieren uit behandelingsgroep 1 worden één keer gevaccineerd met het te onderzoeken combinatievaccin (één dosis geïnactiveerd Coryza vaccin en 1 dosis AE-PD vaccin subcutaan aan de dorsale zijde van de nek in een volume van 0.5 ml). De dieren uit behandelingsgroep 2 worden één keer gevaccineerd met het AE-PD vaccin (één dosis via wingweb-methode). De dieren uit behandelingsgroep 3 en 4 worden niet gevaccineerd. De vaccinatie routes zijn de geregistreerde routes voor de vaccins. Door vaccinatie vindt stimulatie van het immuunapparaat plaats, wat resulteert in de vorming van antilichamen. Acht dagen na de vaccinatie wordt bij de dieren in groep 1 en 2 gecontroleerd of de AE-PD vaccinatie aantoonbaar aangeslagen is; er ontstaat door het pokken virus dan een pokje op de plaats van vaccinatie (het AE virus geeft geen lokale of systemische verschijnselen). Het vleugelvlies en de nekhuid van de dieren uit groepen 3 en 4 wordt ook onderzocht om uit te sluiten of zich daar een pok bevind. Drie weken na vaccinatie wordt het aantal dieren per groep teruggebracht naar 20 (groep 1 en 2), 10 (groep 3) en 5 (groep 4) en vindt challenge plaats van de dieren uit behandelingsgroepen 1, 2 en 3 met een pathogene pokkenstam die is gekarakteriseerd in de dierproef beschreven in bijlage 3.4.4.1. De dieren in groep 4 worden geïnoculeerd met steriel water.

Gedurende 21 dagen na de challenge worden de dieren dagelijks geobserveerd voor het ontstaan van klinische verschijnselen ten gevolge van PD. De dieren worden op de laatste dag geethanaseerd voor post mortaal onderzoek naar afwijkingen die te relateren zijn aan infectie met het pokkenvirus. Van alle dieren wordt op D0, D21 en D42 bloed afgenomen. Het bloed wordt onderzocht op de af- en aanwezigheid van antilichamen tegen trilziekte en pokken.

Tabel 1 Experimenteel ontwerp

| Behandel Groep | 1 | 2 | 3 | 4 |
|------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|
| Aantal dieren (D0) | 23 | 23 | 13 | 7 |
| Test item | - Geïnactiveerd coryza vaccin - Levend AE-PD vaccin | - Levend AE-PD vaccin | - Geen | - Geen |
| D0 (21 dagen leeftijd) | - Bloedafname van alle dieren - Vaccinatie van alle dieren | - Bloedafname van alle dieren - Vaccinatie van alle dieren | - Bloedafname van alle dieren | - Bloedafname van alle dieren |
| D8 (29 dagen leeftijd) | - Controleren op aanwezigheid van pokken. | - Controleren op aanwezigheid van pokken. | - Controleren op aanwezigheid van pokken. | - Controleren op aanwezigheid van pokken. |

| | | |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Palpatie | Controle op aanwezigheid pok (controle vaccinatie op D8) en aanslaan challenge (D29 t/m D35). | Eenmaal per dag op D8 en van D29 t/m D35, alle dieren. |
| Bloedafname. | Afname van bloed uit de vleugelader door middel van punctie. | D0 (21 dagen leeftijd): maximaal 1 ml per dier. D21 (42 dagen leeftijd): maximaal 2 ml per dier. |
| Euthanasie. | Doden voor opvangen van bloed en post-mortaal onderzoek. | Eenmaal op D42 (63 dagen leeftijd), alle dieren. |

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

Groepen 1 t/m 3 en de aantallen dieren hierin zijn gebaseerd op de EP monografie voor pokkenvaccins, die voorschrijft dat 3 weken na vaccinatie per groep tenminste 20 gevaccineerde dieren gechallengeed moeten worden en per dierproef ten minste 10 niet-gevaccineerde dieren. Voor groepen 1, 2 en 3 worden per groep 3 reservedieren aangehouden om uitval van dieren gedurende de periode tussen vaccinatie en challenge op te vangen.

Groep 4 bevat 7 dieren op D0, dat wordt teruggebracht naar 5 dieren op D21. Dit aantal dieren voldoet als controle op de afwezigheid van pokken-achtige leasies tijdens de studie en de afwezigheid van trilziekte-antistoffen, omdat de dieren van hetzelfde ouderkoppel afkomstig zijn en in tijdens dezelfde broedcyclus zijn uitgebroed.

B. De dieren

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

- In deze dierstudie worden niet genetisch gemodificeerde SPF-legkippen gebruikt. Kippen zijn het doeldier van alle 3 vaccins die worden getest.
- De dieren zijn afkomstig van niet-geregistreerde fokbedrijven.
- SPF-pluimvee: deze dieren zijn onder andere vrij van infecties tegen Coryza, pokkenvirus en trilziekte en hebben geen maternale antilichamen tegen de agentia waar in deze studie op wordt getest. Hierdoor worden de uitkomsten van de studie niet beïnvloed.
- Zowel mannelijke als vrouwelijke dieren worden gebruikt: er is geen verschil in gevoeligheid voor het aanslaan van infectie tussen mannelijke en vrouwelijke dieren.
- De leeftijd waarop de dieren geïncubeerd worden in de studie is 21 dagen conform de monografie voor pokkenvaccins. De maximale leeftijd die de dieren kunnen bereiken in deze dierproef is 63 dagen.
- In deze studie worden 132 dieren gebruikt in het geval dat de studie herhaald zou moeten worden. Bij een enkelvoudige uitvoering leidt dit tot de volgende aantallen:
 - Behandelingsgroep 1: 23 dieren
 - Behandelingsgroep 2: 23 dieren
 - Behandelingsgroep 3: 13 dieren
 - Behandelingsgroep 4: 7 dieren

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging

Vervanging is niet mogelijk omdat werkzaamheidsstudies voor deze vaccins in het betreffende dier uitgevoerd dienen te

worden (proefdier is tevens doeldier). Vervangende methoden door middel van celweek, weefselweek of moleculaire testen zijn niet bruikbaar, omdat bij dit soort in vitro-methoden geen interactie tussen gastheer-immuniteit en gastheer-omgeving kan worden nagebootst.

Vermindering

Het bloed van de dieren gewonnen op D42 wordt gebruikt als controle serum voor diagnostische testen waardoor hier geen aparte dierproef voor uitgevoerd hoeft te worden.

Verfijning

- Het pokkenvirus is gekarakteriseerd in de dierproef beschreven in bijlage 3.4.4.1., waardoor wordt gewaarborgd dat de dieren in groep 3 klinische verschijnselen zullen laten zien.

De methode van challenge is op twee niveaus verfijnd ten opzichte van de klassieke methodes. [REDACTED]

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.

Pijn en angst als gevolg van het verrichten van (biotechnische) handelingen zijn inherent aan het uitvoeren van de studie, maar deze handelingen zullen door bevoegd en bekwaam personeel worden verricht. Lijden als gevolg van ziekte zal tot een minimum worden beperkt, omdat als verwacht wordt dat humane eindpunten bereikt zullen worden, het desbetreffende dier geëuthanaseerd wordt. Verder is het model gebaseerd op het opwekken van huidlaesies en niet op de ernstigere difterieform van de ziekte. [REDACTED]

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.

Er zijn geen gegevens bekend met recente Europese challenge stammen. In de literatuur zijn geen artikelen over dit onderwerp (combineren van deze vaccinaties) te vinden. Het is zeer lastig om na te gaan of dergelijke studies al eerder zijn uitgevoerd maar niet gepubliceerd, omdat 1) dierproeven zoals beschreven in deze bijlage niet worden gepubliceerd, omdat ze vaak deel uitmaken van het registratie- of ontwikkelingstraject van het vaccin. Om deze reden ligt het ook niet voor de hand dat duplicatie van een dierproef optreedt, omdat dit leidt tot extra kosten en gegevens en 2) er geen Europese database beschikbaar is waarin kan worden gecontroleerd of deze studies al zijn uitgevoerd. Daarnaast wordt contractueel vastgelegd dat de opdrachtgever ons vrijwaart van het uitvoeren van herhalingen van studies.

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.

Elke groep wordt gehuisvest in een verblijf (isolator) met een oppervlakte van 1.44 m². De hoogste leeftijd die de dieren in deze dierproef bereiken is 9 weken, waarbij het lichaamsgewicht op dat moment schommelt tussen 700-800 gram. In bijlage III van de richtlijn wordt voor dit type dier met dit gewicht als minimale oppervlakte 900 cm² genoemd. In deze studie is de oppervlakte per dier op het einde van de proef 720 cm². De hogere bezettingsgraad in deze studie is noodzakelijk om een goede infectiedruk te handhaven na de challenge. De voerbaklengte ligt tussen 6.5 cm (groep 1 en 2) en 15 cm (groep 3 en 4) per dier. De dieren krijgen onbeperkt voer en de voerbakken zijn halfrond zodat de dieren er goed bij kunnen. Gedurende de 10 jaar dat [REDACTED] isolatoren gebruikt zijn er geen klinische afwijkingen gezien die te wijten waren aan de huisvesting. Het gebruik van isolatoren maakt het mogelijk om de dieren nauwkeurig en op ooghoogte te inspecteren en handelingen te verrichten. Daarnaast kan het klimaat van elke isolator nauwkeurig worden gestuurd. De

dieren krijgen onbeperkt beschikking over water. Wij concluderen dat het huisvesten van kippen in isolatoren niet nadelig is voor het welzijn van de dieren.

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.

Pijnverlichting (en ontstekingsremming) interfereert met de uitkomstparameters van deze dierstudie en is daarom gecontraïndiceerd. Bij het bereiken van humane eindpunten worden de dieren geëuthanaseerd. Met de gebruikte challengemethode worden alleen huidpokken verwacht, waarvan in het veld blijkt dat de dieren er doorgaans weinig last van lijken te hebben. [REDACTED]

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?

- Op een leeftijd van maximaal 10 dagen wordt elk kuiken gesnavelkapt om problemen als gevolg van kannibalisme (dat incidenteel optreedt) bij het ouder worden van het dier te voorkomen. Snavelkappen gaat gepaard met pijn gedurende de handeling zelf en gedurende enkele dagen als onbedoeld het kappen technisch niet helemaal goed is uitgevoerd door beweging van de snavel van het dier.
- Stress door:
 - Transport van dieren van hun bekende verblijf naar de eindbestemming op D42 wat ongeveer 15-20 minuten duurt.
 - Fixatie van het dier voor het uitvoeren van de nodige handelingen en controles.
 - Inductie van de verdoving door inhalatie van een O₂-CO₂-gasmengsel (toenemende concentratie CO₂) ten tijde van euthanasie op D42.
- Pijn door:
 - Subcutane vaccinatie met behulp van een naald.
 - [REDACTED]
 - Aanprikken van de vleugelader voor het verkrijgen van bloed (normale procedure bij kippen).
 - Aanbrengen van identificatie.
- Eventuele optredende ziekteverschijnselen als gevolg van het aanslaan van het pokken virus, bestaande uit:
 - Aspecifieke verschijnselen: opgezette veren; verminderde alertheid.
 - Specifiekere verschijnselen:
 - Pokkenlaesies op de huid (op de plaats van inoculatie en eventueel op andere plaatsen) die als ze niet bacterieel worden gecontamineerd niet leiden tot ongerief;
 - Difterielaesies op de membranen van de mondholte, slokdarm of luchtpijp. Bij uitgebreid voorkomen kunnen deze laesies leiden tot ongerief.
- Onthouden van voer gedurende 2 uur na de donkerperiode voor het euthanaseren op D20 (onthouden van voer is noodzakelijk om het risico van contaminatie van het tijdens de euthanasie opgevangen bloed met inhoud van de krop

te verminderen).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

- De bovengenoemde vormen van welzijnsaantasting zijn inherent aan het uitvoeren van (biotechnische) handelingen in deze studie.
- De klinische verschijnselen die kunnen optreden zijn een gevolg van de challenge.

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

- Voorkomen van deze schadelijke effecten is niet mogelijk, omdat ze inherent aan de dierstudie zijn.
- Vermindering van de ernst van deze effecten wordt bereikt doordat handelingen tot een minimum beperkt worden en alleen worden uitgevoerd door ervaren, getraind en bekwaam personeel.

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.

De volgende humane eindpunten worden gehanteerd:

Een dier wordt uit de studie gehaald bij een combinatie van bol zitten (met een ruw verenkleed) en één of meer van de volgende verschijnselen:

- het niet meer kunnen vertonen van natuurlijke gedrag gedurende 24 uur;
- niet meer zelfstandig kunnen lopen, staan, eten of drinken.
- met open mond ademen en geforceerd ademen (af te lezen aan bewegingen van de buikholte), hetgeen wijst op aantasting van de bovenste luchtweg bij kippen door het pokken virus.

Bovenbeschreven humane eindpunten zijn gemakkelijk herkenbaar door het personeel dat de dieren verzorgt.

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

Op basis van de literatuur en ervaring in het veld met huidpokken is de verwachting dat geen van de dieren dit zal bereiken.

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.

50: matig ongerief.

16: gering ongerief.

Deze aantallen verdubbelen indien de proef herhaald zou moeten worden in geval van invaliditeit.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

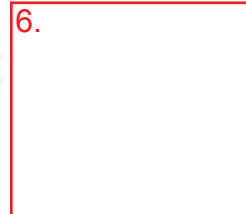
Ja > Geef aan waarom het doden van dieren als eindpunt essentieel is voor deze proef.

Op het einde van de dierstudie (D20) worden dieren geëuthanaseerd, omdat op de dieren pathologisch onderzoek moet worden verricht.

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

Gezondheidsdienst voor Dieren

Postbus 9
7400 AA DEVENTER



**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
AVD426002017836
Bijlagen
2

Datum 2 maart 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 maart 2017. Het gaat om uw project "Bepaling van de interferentie van een geïnacuveerd vaccin met de werkzaamheid van 1ev". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD426002017836. 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:

2 maart 2017

Aanvraagnummer:

2017836

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:

2 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD26002017836

Over uw project

Geplande startdatum:

1 mei 2017

Geplande einddatum:

1 mei 2019

Titel project:

Bepaling van de interferentie van een geïnactiveerd vaccin met de werkzaamheid van 1ev

Titel niet-technische samenvatting:

Interfereert mengen van een geïnactiveerd vaccin met de werkzaamheid van een levend

Naam DEC:

[REDACTED]

Postadres DEC:

[REDACTED]

E-mailadres DEC:

[REDACTED]

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

Overige bijlagen:

- DEC-advies

Ondertekening

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Deventer

Datum:

1 maart 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Gezondheidsdienst voor Dieren

Postbus 9
7400 AA DEVENTER



**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
2017836

Bijlagen

2

Datum 2 maart 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 2 maart 2017
Vervaldatum: 1 april 2017
Factuurnummer: 170836

| Omschrijving | Bedrag |
|------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD 2017836 | € 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.

2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?
De DEC is competent om hierover te adviseren.
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.
Geen van de aanwezige DEC-leden is betrokken bij het betreffende project of de aanvrager. Een van de leden adviseert de instelling in algemene zin over dierproeven en het wettelijk kader.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*Zie handreiking 'Invulling definitie project'; zie bijlage I voor toelichting en voorbeeld*).
Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Hoofddoel van het project is het beantwoorden van de vraag of het toevoegen van een geïnactiveerd Coryza vaccin interfereert met de werkzaamheid van een levend vaccin tegen pokkendifterie en trilziekte bij pluimvee.
Het is helder welke handelingen de individuele dieren zullen ondergaan. Hiermee is het ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondervinden. De aanvrager heeft helder beschreven op basis van welke criteria wordt besloten dat de resultaten van de proeven in bijlage 1 (de karakterisering van de pokkenvirus challengestam) uitvoering van de proeven in bijlage 2 (het bepalen van de interferentie door het Coryza vaccin) rechtvaardigen. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.
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). De indiener heeft dit aangegeven en voor zover de DEC weet is er geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
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 in de projectaanvraag aangekruiste doelcategoriën zijn in overeenstemming met 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 van het project is het beantwoorden van de vraag of het toevoegen van een geïnactiveerd Coryza vaccin interfereert met de werkzaamheid van een levend vaccin tegen pokkendifterie en trilziekte bij pluimvee. De uiteindelijke doelstelling is ██████████, waardoor het dier maar één keer gevaccineerd hoeft te worden in plaats van twee keer. Dit is minder belastend voor het dier en werkt kostenbesparend voor de pluimveehouders. De directe en uiteindelijke doelstellingen zijn nauw verbonden en haalbaar, ook gezien de beschikbare expertise en voorzieningen bij de aanvrager. Het betreft wettelijk verplicht onderzoek waarmee mogelijke problemen als gevolg van het mengen van

vaccins (interferentie) uitgesloten dienen te worden.

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 zijn de proefdieren, de doeldieren waarvoor het vaccin bestemd is, het bedrijf dat de vergunning heeft aangevraagd, [REDACTED] en de pluimveehouders. Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

De uiteindelijke doeldieren (kippen) hebben belang bij een goed werkend, gecombineerd vaccin, waardoor het dier maar voor één handeling en vaccinatie gevangen hoeft te worden in plaats van twee keer. Dit is minder belastend voor het dier. Het belang van de aanvrager is een economisch belang maar geeft ook invulling aan haar maatschappelijke taak als expertisecentrum voor pluimveeziekten. [REDACTED]

Het belang van de pluimveehouder is dat met een goed werkzaam, gecombineerd vaccin op goede wijze gezorgd kan worden voor gezondheid en welzijn van de gehouden dieren en economische schade door ziekte van de dieren voorkomen kan worden. Ook maakt het vaccin het mogelijk om de dieren in één keer tegen meerdere aandoeningen te vaccineren, hetgeen een kostenbesparing oplevert.

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.
Er is geen sprake van substantiële milieueffecten als gevolg van het onderzoek.

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*).

De aanvrager heeft ruime ervaring met het uitvoeren van dit type dierproeven en met het gebruikte diermodel. De dierproeven zijn wettelijk voorgeschreven en derhalve verregaand gestandaardiseerd. De commissie is er van overtuigd dat de ervaring en expertise bij de gebruiker er toe zal leiden dat de doelstelling haalbaar is, dat er zorgvuldig met de proefdieren gewerkt zal worden en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.

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 commissie is van oordeel dat het project goed is opgezet, dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling in het kader van het project. De dierproeven zijn wettelijk voorgeschreven en derhalve verregaand gestandaardiseerd. Tevens is aannemelijk gemaakt dat de uitkomsten statistisch goed toetsbaar zijn. De commissie is er van overtuigd dat de doelstellingen van dit project haalbaar zijn.

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*).

X Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)

Er wordt slechts een beperkte mate van pijn verwacht. Overigens is de behandeling van pijn en klinische symptomen gecontra-indiceerd voor deze studie, aangezien het gebruik van NSAID's of andere pijnstillers interfereert met de uitkomsten van de studie.

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 dieren worden voor een deel van het project gehuisvest in isolatoren met een oppervlakte van 1.44 m². Dit is kleiner dan de minimale omvang van de leefruimte van 2 m² zoals genoemd in bijlage III van de richtlijn. In bijlage III van de richtlijn wordt verder voor dit type dier met dit gewicht als minimale oppervlakte 900 cm² per dier genoemd, wat wél aangehouden wordt gedurende het grootste deel van de tijd. Alleen aan het eind van de studie kan de ruimte per dier hier licht onder zakken. De hoge bezettingsgraad in deze studie is noodzakelijk om een goede infectiedruk te handhaven na de challenge. Daarmee wordt aansluiting gevonden bij een bezettingsgraad volgens de praktijknormen voor de betreffende diersoort, en dit laatste is essentieel vanwege het doel van de dierproef. De aanvrager is op grond van de eigen ervaring met dit type huisvesting van oordeel dat de huisvesting in isolatoren niet nadelig is voor de dieren. De commissie heeft de afwijkende huisvestingsomstandigheden meegewogen in haar afweging.
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*).
Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De welzijnsaantasting is matig als gevolg van de biotechnische handelingen en de effecten van de challenge (140 dieren). Voor de dieren die geen challenge ondergaan blijft de welzijnsaantasting beperkt tot licht (32 dieren).
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 snavelkappen en door het ontstaan van, op zichzelf meestal niet pijnlijke, pokkenlaesies op de huid. Daardoor verandert hun uiterlijk en gedrag.
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*).
De commissie is van oordeel dat de criteria voor humane eindpunten voldoende specifiek gedefinieerd zijn en toegesneden zijn op het experiment. Op basis van eerdere ervaringen met dit diermodel wordt ingeschat dat geen van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken. De commissie onderschrijft deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

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 dierproeven zijn wettelijk voorgeschreven. De werkzaamheid van een levend vaccin tegen pokken difterie en trilziekte bij pluimvee na bijmenging van een ander geïnactiveerd vaccin, kan alleen onderzocht worden door de dieren te vaccineren met het mengsel en ze vervolgens te challengen met het pokkenvirus om te controleren of het vaccin bescherming biedt tegen pokkendifterie. De werkzaamheid van de trilziekte-component van het vaccin kan, in tegenstelling tot bij de pokkencomponent, worden vastgesteld met behulp van serologische bepalingen in dezelfde dieren (antilichaamtiter), waardoor geen challenge nodig is. Dit draagt bij aan zowel vermindering, als verfijning.
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*).
- Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De dierproeven zijn wettelijk voorgeschreven. Het aantal dieren is gebaseerd op de EP-monografie voor pokkenvaccins.
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*).
- Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Kippen zijn het doeldier van deze dierproeven. De DEC is er van overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
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.
- [REDACTED]
- [REDACTED] waardoor niet te verwachten is dat deze specifieke studie met de combinatie van deze twee producten al eerder elders is uitgevoerd. Dat al eens een vergelijkbare studie met een combinatie van vergelijkbare vaccins is gedaan valt niet uit te sluiten, te meer daar dergelijke studies zelden gepubliceerd worden. Door aanvrager wordt gezorgd dat de opdrachtgever waarborgt dat geen onnodige herhaling van studies wordt verricht.

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*).
- Voor deze studie zullen dieren van beide geslachten worden ingezet. Er is geen reden om aan te nemen dat de vaccins en het pokkenvirus in één van beide geslachten beter aanslaan dan in het andere.
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*).

Alle voor deze dierproef gebruikte dieren worden gedood in het kader van de proef, t.b.v. nader post mortem onderzoek van de weefsels en organen.

Er wordt een voor de dieren passende dodingsmethode gebruikt, vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

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.

Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gedood om niet-wetenschappelijke redenen.

NTS

21. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?

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

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*).
Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?

2. 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*).

Het grootste deel van de proefdieren ervaart een matige aantasting van het welzijn. Voor een kleiner deel geldt dat zij een lichte aantasting van het welzijn zullen ervaren. De doelstellingen kunnen niet zonder gebruik van dieren (in dit geval het doeldier) worden behaald. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.

De uiteindelijke doeldieren hebben belang bij een goed werkzaam combinatievaccin, teneinde ze te beschermen tegen aantasting van hun welzijn als gevolg van ziekte. Verder kan het aantal vaccinatiemomenten door de combinatie van vaccins worden gereduceerd. Deze wettelijk voorgeschreven experimenten beschermen ook de doeldieren tegen behandeling met ondeugdelijke diergeneesmiddelen.

Pluimveehouders hebben een economisch belang bij het terugbrengen van het aantal vaccinatiemomenten, omdat daarmee de kosten worden gereduceerd. De aanvragende instelling heeft een economisch belang bij het op verzoek van derden uitvoeren van proeven in het kader van gezondheidszorg van landbouwhuisdieren. Dit geeft bovendien invulling aan haar maatschappelijke taak als expertisecentrum voor pluimveeziekten. Dit draagt er toe bij dat de experimenten zorgvuldig en met een grote kans op succes worden uitgevoerd. [REDACTED]

In het licht van de bovengeschetste belangen voor de verschillende belanghebbenden (inclusief de doeldieren), acht de commissie [REDACTED]

■■■■■■■■■■ een substantieel belang. De voorgestelde experimenten zijn daarvoor noodzakelijk.

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 commissie is overtuigd van het belang van de doelstelling: het beantwoorden van de vraag of het toevoegen van een geïnactiveerd Coryza vaccin interfereert met de werkzaamheid van een levend vaccin tegen pokkendifterie en trilziekte bij pluimvee, met als uiteindelijk doel ■■■■■■■■■■. Dit heeft belangrijke voordelen voor de doeldieren, de pluimveehouders ■■■■■■■■■■.

De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De opzet van de voorgestelde dierproeven is wettelijk bepaald. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 - X De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. 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*).
Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd - zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Gezondheidsdienst voor Dieren

██████████
Postbus 9
7400 AA DEVENTER
██████████

**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
AVD426002017836
Bijlagen
1

Datum 17 maart 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ██████████,

Op 1 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bepaling van de interferentie van een geïnactiveerd vaccin met de werkzaamheid van levend vaccin gericht tegen pokkendifterie en trilziekte bij pluimvee" met aanvraagnummer AVD426002017836. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

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

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 "Bepaling van de interferentie van een geïnactiveerd vaccin met de werkzaamheid van levend vaccin gericht tegen pokkendifterie en trilziekte bij pluimvee" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 mei 2017 tot en met 1 mei 2019.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie ██████████ gevoegd. 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:
17 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD426002017836

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: Gezondheidsdienst voor Dieren
Adres: Postbus 9
Postcode en plaats: 7400 AA DEVENTER
Deelnemersnummer: 42600

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 mei 2017 tot en met 1 mei 2019, voor het project "Bepaling van de interferentie van een geïnactiveerd vaccin met de werkzaamheid van levend vaccin gericht tegen pokkendifterie en trilziekte bij pluimvee" met aanvraagnummer AVD426002017836, volgens advies van Dierexperimentencommissie [REDACTED]. 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 1 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 28 februari 2017, ontvangen op 1 maart 2017.

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|---------------|------------------------------|-------------|
| 3.4.4.1 De karakterisering van een recent uit West-Europa geïsoleerde pokkenvirusstam | | | | |
| | Kippen / SPF-dieren | 40 | Matig | |
| 3.4.4.2 Bepaling van de interferentie van een geïnactiveerd Coryza vaccin met de werkzaamheid van een levend vaccin tegen pokkendifterie en trilziekte bij pluimvee | | | | |
| | Kippen / SPF-dieren | 132 | 76% Matig 24% Licht | |

Voorwaarden

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

Aanvraagnummer:

AVD426002017836

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:

AVD426002017836

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:

AVD426002017836

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. | document NTS 2017851 | 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 | | | | | | |
| 4 | Bijlage | | | x | | | | | | |
| 5 | Ontvangstbevestiging en factuur | | | | x | | x | x | | |
| 6 | Verzoek om aanvullende informatie | | | | x | | x | x | | |
| 7 | Antwoord op verzoek om aanvullende informatie | | | x | | | | | | |
| 8 | DEC advies | | | | x | | x | x | | |
| 9 | Advies CCD | | x | | | | | | x | |
| 10 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | | |



08 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 10800 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen | |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt. | Naam instelling of organisatie | Universiteit Utrecht |
| | | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [REDACTED] |
| | | KvK-nummer | 30275924 |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | Straat en huisnummer | Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht |
| | | Postbus | 12007 |
| | | Postcode en plaats | 3501AA Utrecht |
| | | IBAN | NL27INGB0000425267 |
| | | Tenaamstelling van het rekeningnummer | Universiteit Utrecht |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker. | (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| | | Functie | 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 | [REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| | | Functie | Associate professor |
| | | 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 - 3 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 3 - 2023 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Immunisaties ten behoeve van het verkrijgen van hybridomas
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Verkrijgen van specifieke antilichamen via immuuncellen uit de muis
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC | DEC Utrecht |
| Postadres | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl |

4 Betaalgegevens


- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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 Utrecht

Datum 31-01-2017

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.

Dit onderzoek is in samenwerking met Bioceros BV in Utrecht gestart, zie hiervoor ook

<http://bioceros.com/>. Het immuunsysteem speelt een cruciale rol als verdedigingsmechanisme tegen ziekteverwekkers. Ten einde het immuunsysteem te bestuderen en te kunnen moduleren in patiënten is het van essentieel belang om monoclonale antistoffen te verkrijgen die gebruikt kunnen worden als diagnostische of therapeutische werktuig. Hierbij wordt gedacht aan monoclonale antistoffen gericht tegen diverse surface markers op de cellen van het immuunsysteem. Belangrijke cellen in deze zijn B- en T-cellen, maar ook diverse antigeen presenterende cellen (APC), bijvoorbeeld dendritische cellen. Voor veel van de antigenen zijn monoclonale antistoffen te verkrijgen, maar die zijn alleen bedoeld en geschikt voor detectie van expressie van dit antigeen. Het doel van dit onderzoek is monoclonalen te selecteren en ontwikkelen die specifiek-functioneel werkzaam zijn en vanwege die zeer specifieke activiteit potentieel gebruikt kunnen worden als nieuw therapeuticum voor gebruik in de mens. Dit voorstel beoogt antilichaamproducerende B cellen te genereren tegen klinisch relevante (surface) markers zoals CD36 (Rać ME, 2007. Mol. Med. 13: 288–96), CD134 (OX40, <http://www.gsk.com/en-gb/media/press-releases/2015/gsk-and-merck-to-study-immunotherapy-combination-as-potential-cancer-treatment/>). myostatine (Han HQ, 2013 Int J Biochem Cell Biol. 45:2333-47) en nog nader te bepalen targets, om deze vervolgens op te kweken tot hybridoma's. De door deze hybridoma's geproduceerde monoclonale antilichamen worden of zullen worden gebruikt in alle denkbare inflammatoire aandoeningen waar het immuunsysteem een rol speelt, zoals rheumatoïde arthritis, IBD, multiple sclerosis, Alzheimer's, infectieuze ziekten als Ebola en veel soorten kanker. In deze ziekten wordt met wisselend succes ook al klinische trials gedaan met diverse antilichamen. Een antilichaam tegen TNF-alpha wordt bijvoorbeeld al succesvol toegepast in darmaandoeningen als IBD.

De meest robuuste manier om monoclonale antilichamen te verkrijgen is de klassieke benadering van Kohler en Milstein: "the hybridoma technology". Hierbij worden muizen geïmmuniseerd met het antigeen van interesse en wordt optimaal gebruik gemaakt van de biologische variabiliteit die optreedt bij een antilichaam reactie in vivo. Op deze manier is het mogelijk om veel verschillende antilichamen (isotypen en idiotypen) te maken tegen hetzelfde antigeen, die volslagen verschillende functionele activiteit hebben. Op die manier kan het antilichaam met de gewenste functionaliteit geselecteerd worden. Bij immunisatie wordt de immuunreactie in de dieren gevolgd door bloedafname, waarna bij een goede immuunreactie (gemeten door de antilichaamspiegel), de muizenlymfocyten worden verwijderd en gefuseerd met myeloma cellen om ze te immortaliseren. Na het genereren van deze zgn hybridomas wordt uit deze verzameling van verschillende cel-lijnen de hybridoma geselecteerd die een antilichaam maakt dat functioneel actief is. De gebruikte testen hiervoor vallen echter buiten deze projectaanvraag en worden gedaan in het eigen laboratorium van Bioceros. In het kort, een in vitro assay die voorspellend gaat zijn voor het potentiële klinisch gebruik zal dit gaan bepalen. In sommige indicaties zullen antistoffen nodig zijn die signaal transductie van een receptor inhiberen (antagonist; bv voor CD36) terwijl in andere indicaties juist de signaal transductie van een receptor moet worden gestimuleerd (agonist; bv CD134). Bovendien mogen de antistoffen ook niet onverwachts binden aan andere weefsels waar geen target tot expressie komt (de zogenaamde kruisreactiviteit). Deze niet bedoelde kruisreactiviteit kan resulteren in ernstige bijwerkingen van antilichamen wanneer ze later als systemische behandeling gaan worden gebruikt in patiënten. Het is daarom van cruciaal belang om het juiste antilichaam te selecteren en te testen.

Als alternatief voor antilichaam ontwikkeling wordt tegenwoordig vaak de "antibody phage display" genoemd (Wu CH, 2016, J Biomed Sci. 23: 8). Ieder mens heeft een verzameling van antistoffen. Deze antistoffen zijn gericht tegen ziekteverwekkers (lichaamsvreemde antigenen, zoals bacteriën en virussen). Via moleculaire biologische technieken kan de genetische informatie (zgn 'antibody library') welke codeert voor fragmenten (ie, variabele delen, zoals scFv's en Fab's) van deze antistoffen op bacteriofagen (een virus welke een bacterie kan infecteren) worden tentoongesteld (zgn 'phage display'). Voor 'phage display' wordt dus DNA dat codeert voor variabele delen van een antistof geplakt aan het bacteriofaag DNA dat codeert voor een eiwit aan de buitenkant van de bacteriofaag. Op deze manier komt de antistof aan de buitenkant van de bacteriofaag terecht, en iedere bacteriofaag brengt zodoende 1 uniek antistof tot expressie. Dit wordt gedaan met de gehele 'antibody library'. Vervolgens wordt deze verzameling van bacteriofagen geïncubeerd (dmv 'biopanning') met het antigen van interesse. De niet-bindende bacteriofagen worden weggespoeld en de bindende bacteriofagen worden opnieuw vermenigvuldigd in hun gastheerbacterie. Uiteindelijk wordt de sequentie van het ingebrachte stuk DNA welke codeert voor de variabele delen van de specifiek bindende antistof bepaald, en vervolgens wordt deze genetische informatie gebruikt om humane IgG's te maken. Hierbij worden de geselecteerde variabele delen geplakt aan de constante delen (ie, bekende sequenties van zware en lichte ketens) van humane IgG's.

Ofschoon de nieuwe 'antibody phage display'-techniek voor antilichaam ontwikkeling een goed alternatief is/likt te zijn ter vervanging van de klassieke immunisatie/hybridoma-techniek, heeft de 'phage display'-techniek voor ons doel een aantal tekortkomingen en is geen alternatief in onze situatie:

- Allereerst is het kiezen van de juiste en meest complete phage display library (het aantal aminozuur residuen) met de juiste stabiliteit en kwaliteit niet eenvoudig en nog niet mogelijk zonder grote, zo niet enorme investeringen in tijd en reagentia. Dit is nu en in de nabije toekomst niet mogelijk in de laboratoria van Bioceros en het IRAS.
- Verder is het essentiële verschil tussen de twee technieken voor ons specifieke doel dat de immunisatie/hybridoma-techniek resulteert in antistoffen tegen humane antigenen die immunogeen/lichaamsvreemd zullen zijn voor de muis (ie, opwekken van een immuunrespons in de muis), terwijl de 'human antibody phage display'-techniek alleen antistofbinders (ie, fragmenten van antistoffen, zoals scFv's of Fab's) tegen antigenen identificeert die in principe immunogeen/lichaamsvreemd voor de mens zijn/zijn geweest (lees: dus antistofbinders niet gericht tegen humane/lichaamseigen antigenen). Voor ons onderzoek en klinische toepassing is het van wezenlijk belang dat wij antistoffen oppikken tegen humane antigenen, bv humane oplosbare antigenen en cellulaire membraangebonden antigenen, zoals humane 'immunocheckpoint regulators' en receptoren.
- Een groot bijkomend voordeel van de immunisatie/hybridoma-techniek is dat wij in principe alleen die antistoffen op zullen gaan pikken met hoge affiniteit voor hun respectievelijke antigenen, omdat wij alleen hybridoma's zullen gaan maken van antilichaam producerende muizen B-cellen ontwikkeld na de secundaire/memory immuunrespons (in tegenstelling tot IgM's met lage affiniteit opgewekt tijdens/na de primaire immuunrespons). Maw we selecteren alleen 'isotype-switched' IgG-klasse antistoffen, welke de zgn 'natural' affiniteitsmaturing van de variabele domeinen al hebben ondergaan. Antistofbinders verkregen dmv de 'phage display'-techniek moeten vaak na selectie nog een affiniteitsmaturingstap(pen) ondergaan dmv mutagenese; een proces dat specifieke kennis vereist en bovendien een hele uitdaging kan zijn afhankelijk van gevonden sequenties van de variabele domeinen.
- Een tweede voordeel van de immunisatie/hybridoma-techniek is dat de verkregen antistoffen vroeg na selectie - dat is meestal binnen 4 maanden na de start van immunisatie - direct getest kunnen gaan op hun in vitro biologische activiteit in het juiste antistof-format (ie, bivalente IgG), terwijl dat dit met de geselecteerde monovalente scFv/Fab antistoffragmenten verkregen met de 'phage display'-techniek pas kan nadat deze zijn omgezet in het uiteindelijke bivalente IgG-format.
- Het intellectuele eigendom van de huidige beschikbare 'phage display'-technieken is erg complex, veelal is deze techniek alleen beschikbaar in gespecialiseerde bedrijven. Het vrije gebruik hiervan kan alleen bereikt worden na verkrijging van licentie(s); deze licentiekosten zijn niet op te brengen voor het IRAS of Bioceros.
- Zoals eerder genoemd, de fabricage van goede humane antistof 'libraries' - een verzameling aan humane genen die coderen voor humane antistoffen, welke een essentiële stap vormt voor het uiteindelijk succes van 'phage display' - vergt specifieke kennis, is een langdurig proces, en brengt hoge kosten met zich mee. Deze investeringskosten zijn niet op te brengen voor Bioceros of IRAS.

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?

Verkrijgen van therapeutisch-werkzame monoclonale antistoffen tegen nader te bepalen immuun gerelateerde targets.

3.3 Belang

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

In diverse ziektebeelden (autoimmuunziekten zoals IBD, multiple sclerose, reumatoïde artritis, allergie, kanker etc) speelt het immuunsysteem een belangrijke rol, daarom is verder onderzoek hierna van belang. Monoclonale antistoffen zijn een essentiële tool voor het onderzoek maar kunnen als ze juist worden geselecteerd ook dienen als nieuw geneesmiddel voor de bovengenoemde indicaties. Kanker en ontstekingsaandoeningen zijn belangrijke oorzaken van ziekte en sterfte in de mens. Klassieke

therapieën schieten vaak tekort bij deze ziekten, en de verwachting is dat meer specifiek gerichte medicijnen (zoals antistoffen) een hogere therapeutische index zullen hebben. Het ontwikkelen van deze nieuwe antilichamen (die tegen tal van mogelijk therapeutische targets gericht kunnen zijn), kan dan ook in hoge mate bijdragen aan de behoefte aan nieuwe specifieke therapieën. De ontwikkeling van monoclonale antistoffen is in vergelijking met andere nieuwe therapeutica zeer effectief en vergt een relatief korte ontwikkeling. Als voorbeeld van de effectiviteit van deze opzet kan genoemd worden dat monoclonale antistoffen ontwikkeld door Bioceros (na immunisatie door onderzoekers van het IRAS) volgens de eerder genoemde methode tegen OX40 (CD134) en CTLA4 momenteel getest worden in klinische toepassingen.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Specifieke antilichaam producerende cellen worden geselecteerd uit de milt van muizen die geïmmuniseerd worden met het eiwit/antigeen.

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

Bioceros selecteert en doet de inschatting van de mogelijkheden van antistoffen tegen specifieke antigenen (commercieel, patent-technisch en praktisch). In samenwerking met het IRAS wordt de immunisatie tegen dit antigeen opgezet. Voor de immunisatie worden muizen geïnjecteerd met het antigeen samen met adjuvant (bijvoorbeeld RIBI). Na booster injecties (zonder adjuvant, 2 maal in 1 week) volgt een antilichaam titer bepaling uit bloed. Als deze titer niet hoog genoeg is volgen er nog meer boosterinjecties zonder adjuvant (maximaal 2). Hiervoor en hierna wordt er 1-2 wekelijks bloed afgenomen, tot de titer hoog genoeg is en de muizen gedood worden. Hierna worden de muizenlymfocyten geïsoleerd uit de milt en na selectie gefuseerd met myeloma cellen om ze te immortaliseren (generen van hybridomas).

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.

Door de immunisaties zal de antilichaamproductie tegen het antigeen gestimuleerd worden. Als deze productie optimaal is worden de dieren gedood, en de milt wordt gebruikt om antilichaam producerende cellen te isoleren, waarna hieruit hybridomas worden gegenereerd in vitro. Mocht er 14 dagen na de laatste (dus na maximaal 4) boosterinjectie geen of een te lage antilichaam titer bereikt worden wordt de immunisatie stopgezet en de muizen gedood.

De antilichaam titer in het bloed van de muizen bepaald dus het tijdstip waarop de muizen gedood worden en het in vitro hybridoma gedeelte wordt ingezet.

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|------------------------|
| 1 | Immunisatie van muizen |
| 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. | 10800 | |
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Universiteit Utrecht | |
| 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. | Volgnummer | Type dierproef |
| | 1 | Immunisatie van muizen |

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.

Antilichaam-vormende cellen worden verkregen uit de milt van muizen en onsterfelijk gemaakt door ze te fuseren met tumorcellen. De zo verkregen hybridoma's maken continu de gewenste antilichamen. Om antistof-vormende cellen te verkrijgen is het nodig muizen te injecteren met het eiwit waartegen antistoffen gewenst zijn. Dit onderzoek wordt gedaan in proefdieren omdat de vorming van specifieke antistoffen een complex proces is, wat alleen in een intact lichaam (in vivo) plaats vindt. Muizen worden geïmmuniseerd voor het maken van antistoffen tegen eiwitten.

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.

Dieren worden behandeld volgens de "Code of practice voor het immuniseren van proefdieren"
Immunisatie: Binnen 42 dagen worden muizen 2 tot 3 maal subcutaan of intraperitoneaal (afhankelijk van gebruikt adjuvant) geïnjecteerd met een oplossing met antigeen en adjuvant. Als adjuvant word bij voorkeur een olie-in-water emulsie gebruikt zoals bijvoorbeeld RIBI of SIGMA adjuvant (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/s6322?lang=en®ion=NL>).
Booster: Na immunisatie krijgen muizen een intraperitoneale injectie (Booster) om de antilichaamproductie te stimuleren. Deze booster wordt in ieder geval 1 keer herhaald de volgende dag en hierna 1keer per 1-2 weken tot een optimale antilichaamspiegel is bereikt.
Bloedafname; Voor, tijdens en na de immunisatie en booster wordt bloed afgenomen om de antilichaam spiegels te bepalen. Maximaal 8 ml/kg/14 dagen.
Euthanasie: Bij een optimale of maximale antilichaamspiegel worden de dieren gedood. Hierna wordt de milt geïsoleerd om hieruit in vitro B cellen te verkrijgen en deze vervolgens op te kweken tot hybridoma's.

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

Dit voorstel beoogt antilichaamproducerende B cellen te genereren tegen antigenen om deze vervolgens op te kweken tot hybridoma's. Lymfocyten worden geselecteerd op antilichaam producerende B cellen, die hierna gefuseerd worden tot hybridoma. Deze hybridoma's worden hierna gescreend op moab productie. Aangezien er

maar relatief heel weinig B-cellen specifiek zijn voor 1 onderdeel (epitooop) van 1 antigeen vergt dit proces veel lymfocyten als start. Het minimum aantal dieren van 3 per immunisatie is gekozen op basis van uitgebreide eerdere ervaring met immunisaties om voldoende specifieke B cellen te verkrijgen. De efficiëntie van antilichaamproductie (responders) is verschillend tussen individuele dieren of soms reageren niet (non-responders). Voor een succesvolle immunisatie en uiteindelijke screening is daarom drie dieren per immunisatie noodzakelijk. Er worden circa 200-250 x 10E6 lymphocyten geïsoleerd / 3 dieren, waarmee uiteindelijk ~40x 96-wells platen kunnen worden ingezet, hetgeen zal resulteren in voldoende hybridoma's om te screenen voor antilichaamproductie.

B. De dieren

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

Mannelijke of vrouwelijke BALB/c of C57BL/6 muizen worden standaard gebruikt om (monoclonale) antistof-producerende B cellen in op te wekken. Beide veel gebruikte muizenstammen geven de hoogste en meest efficiënte antilichaamproductie.

Er zullen ongeveer 12 immunisaties per jaar ingezet worden (Bioceros verwacht 12 targets per jaar te willen inzetten). Dus totaal worden er 12 x 3 muizen x 5 jaar = 180 muizen aangevraagd.

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 methode Kohler & Milstein voor de ontwikkeling van antistoffen is een zeer beproefde methode sinds meer dan 30 jaar.

Als alternatief voor antilichaam ontwikkeling wordt tegenwoordig vaak de "antibody phage display" genoemd (Wu CH, 2016, J Biomed Sci. 23: 8). Ieder mens heeft een verzameling van antistoffen. Deze antistoffen zijn gericht tegen ziekteverwerkers (lichaamsvreemde antigenen, zoals bacteriën en virussen). Via moleculaire biologische technieken kan de genetische informatie (zgn 'antibody library') welke codeert voor fragmenten (ie, variabele delen, zoals scFv's en Fab's) van deze antistoffen op bacteriofagen (een virus welke een bacterie kan infecteren) worden tentoongesteld (zgn 'phage display'). Voor 'phage display' wordt dus DNA dat codeert voor variabele delen van een antistof geplakt aan het bacteriofaag DNA dat codeert voor een eiwit aan de buitenkant van de bacteriofaag. Op deze manier komt de antistof aan de buitenkant van de bacteriofaag terecht, en iedere bacteriofaag brengt zodoende 1 uniek antistof tot expressie. Dit wordt gedaan met de gehele 'antibody library'. Vervolgens wordt deze verzameling van bacteriofagen geïncubeerd (dmv 'biopanning') met het antigeen van interesse. De niet-bindende bacteriofagen worden weggespoeld en de bindende bacteriofagen worden opnieuw vermenigvuldigd in hun gastheerbacterie. Uiteindelijk wordt de sequentie van het ingebrachte stuk DNA welke codeert voor de variabele delen van de specifiek bindende antistof bepaald, en vervolgens wordt deze genetische informatie gebruikt om humane IgG's te maken. Hierbij worden de geselecteerde variabele delen geplakt aan de constante delen (ie, bekende sequenties van zware en lichte ketens) van humane IgG's

Ofschoon de nieuwe 'antibody phage display'-techniek (Wu CH, 2016, J Biomed Sci. 23: 8) voor antilichaam ontwikkeling een goed alternatief is/likt te zijn ter vervanging van de klassieke immunisatie/hybridoma-techniek, heeft deze 'phage display'-techniek voor ons doel een aantal tekortkomingen en is geen alternatief in onze situatie. Zie hiervoor het projectvoorstel, 3.1.

Verfijning:

Gezien de ethische bezwaren tegen het gebruik van Freund's adjuvant, hebben wij in de afgelopen jaren onderzoek gedaan naar een alternatieve aanpak. In onze huidige aanvraag zullen wij minder belastende alternatieve adjuvants zoals Ribi's adjuvant (olie-in-water emulsie) gaan gebruiken. Deze gaven in eerdere immunisaties goede immuunresponsen, en bovendien zeer milde of geen bijwerkingen en weinig ongerief in geïnjecteerde muizen (in tegenstelling tot het water-in-olie emulsie Complete Freund's adjuvant).

Vermindering:

Per immunisatie wordt het minst mogelijke aantal dieren gebruikt die het meest efficiënt zal leiden tot de productie van antilichaam hybridomas.

Verfijning:

Muizen worden zeer regelmatig gemonitord, om eventueel ongerief tijdig te kunnen vaststellen, en onnodig lijden te voorkomen. Als (onverwacht) ernstig ongerief wordt vastgesteld worden muizen geëuthanaseerd.

Er zal in deze aanvraag geen gebruik gemaakt van het belastende (in)complete Freund's adjuvant, In onze huidige aanvraag zullen wij voornamelijk olie-in-water emulsies zoals Ribi als adjuvant gaan gebruiken, Dit adjuvant resulteerde in eerdere immunisaties milde of geen zichtbare bijwerkingen in en weinig ongerief bij betreffende muizen (in tegenstelling tot het water-in-olie emulsie Freund's adjuvant).

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

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

Zoals eerder genoemd is de keuze van het gebruikte adjuvant ook gebaseerd op het verminderen van pijn en lijden in de geïmmuniseerde muizen.

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.

nvt

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

toegepast?

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er zijn geen vormen van welzijnsaantasting die wij kunnen voorzien

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

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.

algemene klinische verschijnselen(houding, gedrag, conditie vacht, etc.) worden dagelijks gemonitord. Bij verschijnselen die duiden op ernstig ongerief worden de dieren geeuthanaseerd. (HEP) Ook non-responders (geen antilichaam titer) worden eerder uit de proef genomen (HEP).

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

Naar aanleiding van eerdere experimenten wordt geschat dat minder dan 5% van de dieren kans maakt de beschreven HEP te behalen

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.

'matig " Het ongerief blijft beperkt tot stress als gevolg van het hanteren/fixeren van de dieren bij het uitvoeren van verschillende behandelingen. Maar vanwege het gebruik van een adjuvans en het aantal injecties en bloedafnames toch matig 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.

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

Universiteit Utrecht



Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002017851

Bijlagen

2

Datum 1 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 31 januari 2017. Het gaat om uw project "Immunisaties ten behoeve van het verkrijgen van hybridomas". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002017851. 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:

1 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD108002017851

Datum:
1 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017851

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: ██████████
KvK-nummer: 30275924
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████
Functie: Onderzoeker
Afdeling: ██████████
Telefoonnummer: ██████████
E-mailadres: ██████████

Datum:
1 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017851

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Associate professor
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: 1 maart 2023
Titel project: Immunisaties ten behoeve van het verkrijgen van hybridomas
Titel niet-technische samenvatting: Verkrijgen van specifieke antilichamen via immuuncellen uit de muis
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Utrecht
Datum: 31 januari 2017

Datum:
1 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017851



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002017851
Bijlagen
2

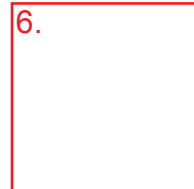
Datum 1 februari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 1 februari 2017
Vervaldatum: 3 maart 2017
Factuurnummer: 170851
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

| Omschrijving | Bedrag |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002017851 | € 1035,- |

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002017851

Datum 14 februari 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 31 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Immunisaties ten behoeve van het verkrijgen van hybridomas" met aanvraagnummer AVD108002017851. 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

Kunt u de criteria op basis waarvan targets geselecteerd worden opnemen in de aanvraag?

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

Datum:

14 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD108002017851

Aanvullende informatie bij aanvraag projectvergunning Dierproeven AVD108002017851

De volgende selectiecriteria worden gebruikt om de targets voor immunisaties te bepalen:

1. De strategie is om therapeutische antilichamen tegen targets te selecteren voor de behandeling van ziekten waar nog een grote medische nood bestaat (zgn. *'unmet medical need'*), zoals kanker, autoimmuunziekten, zeldzame/weesziekten, en infectieziekten. Voorbeelden van therapeutische (remmende of activerende) antilichamen, die in het verleden via deze aanpak door Bioceros zijn gemaakt, waren gericht tegen targets zoals *'immune checkpoint regulators'* op witte bloedcellen (b.v. CD40, OX40 en HVEM) en complement factoren (b.v. complement C1 en C2). Van deze voorbeelden wordt er op dit moment 1 getest in klinische studies en het is de verwachting dat de volgende in 2018 de kliniek ingaat. De andere voorbeelden zijn in verschillende stadia van pre-klinische ontwikkeling.
2. Omdat de investeringen na de immunisatie enorm zullen zijn, zal er naast het bovengenoemde selectie criterium ook nog aan een aantal andere randvoorwaarden voldaan moeten worden. Als eerste zal er een uitgebreid inbreukonderzoek worden gedaan (ook wel *'freedom to operate'* of kortweg FTO-onderzoek genoemd; dit om te voorkomen dat er geen inbreuk op bestaande octrooirechten van derden wordt gemaakt, en zodoende te waarborgen dat de ontwikkeling van nieuwe antilichamen niet wordt geblokkeerd). Ten tweede zal er een marktonderzoek (is er behoefte aan de nieuwe aanpak en wat is de concurrentie?) worden uitgevoerd. Ten slotte en misschien wel de belangrijkste vraag die beantwoord dient te worden: Kan het laboratorium-technisch onderzoek relatief eenvoudig worden uitgevoerd om te faciliteren dat de juiste antilichamen geselecteerd kunnen worden voor verdere ontwikkeling?

Door deze zeer strenge selectieprocedure vallen soms ook wetenschappelijk interessante strategieën af omdat verder ontwikkeling mogelijk geblokkeerd kan worden, maar daarentegen worden hierdoor onnodige investeringen en onnodig gebruik van proefdieren voor immunisaties voorkomen.



A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2016.II.814.026
2. Titel van het project : Immunisaties ten behoeve van het verkrijgen van hybridomas
3. Titel van de NTS : Immunisatie ten behoeve van het maken van antistoffen tegen
(menselijke) eiwitten

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: 02-11-2016
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 16-11-2016
- anderszins behandeld:
- termijnonderbreking(en) van / tot : 22-11-2016/06-01-2017
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 24-01-2017

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: 22-11-2016
- Datum antwoord: 06-01-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: U schrijft niets over hoe de gemaakte antistoffen getest worden. Doet u dat in andere projecten? Zo ja, dan in het projectvoorstel noemen dat het testen geen onderdeel is van de projectaanvraag. Zo niet, dan is donormateriaal nodig. Ook dit moet dan worden opgenomen in het projectvoorstel.

Dit wordt nu vermeld in de tekst.

- 3.1 Achtergrond: In het projectvoorstel wordt phage display genoemd als alternatief voor het ontwikkelen van antilichamen. De DEC mist echter een korte uitleg van deze techniek. Daarnaast is de motivering voor het niet toepassen van deze methode onvoldoende. Er wordt te vaak genoemd dat de methode niet wordt toegepast vanwege tijd- en kostenoverwegingen, terwijl de technische en wetenschappelijke bezwaren onderbelicht blijven. Ook is het de DEC niet helder waarom de alinea over de ethische bezwaren van Friends adjuvant hier genoemd wordt, dit hoort bij verfijning. De DEC raadt u aan om het geheel samen te vatten in enkele zinnen, waarbij kort wordt toegelicht wat voor een techniek phage display is en waarom deze techniek voor dit project geen optie is. De alinea over de ethische bezwaren van Friends adjuvant dient geheel verplaatst te worden naar verfijning (bijlage, punt D, vervanging, vermindering en verfijning).

Een uitleg is nu toegevoegd aan de tekst.

De technische en wetenschappelijke bezwaren worden genoemd in deze aanvraag:

- *Allereerst is het kiezen van de juiste en meest complete phage display library (het aantal aminozuur residuen) met de juiste stabiliteit en kwaliteit niet eenvoudig en nog niet mogelijk zonder grote, zo niet enorme investeringen in tijd en reagentia. Dit is nu en in de nabije toekomst niet mogelijk in de laboratoria van XXX en XXX.*
- *Verder is het essentiële verschil tussen de twee technieken voor ons specifieke doel dat de immunisatie/hybridoma-techniek resulteert in antistoffen tegen humane antigenen die immunogeen/lichaamsvreemd zullen zijn voor de muis (i.e., opwekken van een immuunrepons in de muis), terwijl de 'human antibody phage display'-techniek alleen antistofbinders (ie, fragmenten van antistoffen, zoals scFv's of Fab's) tegen antigenen identificeert die in principe immunogeen/lichaamsvreemd voor de mens zijn/zijn geweest (lees: dus antistofbinders niet gericht tegen humane/lichaamseigen antigenen). Voor ons onderzoek en klinische toepassing is het van wezenlijk belang dat wij antistoffen oppikken tegen humane antigenen, bv humane oplosbare antigenen en cellulaire membraangebonden antigenen, zoals humane 'immunocheckpoint regulators' en receptoren.*
- *Een groot bijkomend voordeel van de immunisatie/hybridoma-techniek is dat wij in principe alleen die antistoffen op zullen gaan pikken met hoge affiniteit voor hun respectievelijke antigenen, omdat wij alleen hybridoma's zullen gaan maken van antilichaam producerende muizen B-cellen ontwikkeld na de secundaire/memory immuunrespons (in tegenstelling tot IgM's met lage affiniteit opgewekt tijdens/na de primaire immuunrespons). Maw we selecteren alleen 'isotype-switched' IgG-klasse antistoffen, welke de zgn 'natural' affiniteitsmaturing van de variabele domeinen al*

hebben ondergaan. Antistofbinders verkregen dmv de 'phage display'-techniek moeten vaak na selectie nog een affiniteitsmaturatiestap(pen) ondergaan d.m.v. mutagenese; een proces dat specifieke kennis vereist en bovendien een hele uitdaging kan zijn afhankelijk van gevonden sequenties van de variabele domeinen.

- Een tweede voordeel van de immunisatie/hybridoma-techniek is dat de verkregen antistoffen vroeg na selectie - dat is meestal binnen 4 maanden na de start van immunisatie - direct getest kunnen gaan op hun in vitro biologische activiteit in het juiste antistof-format (ie, bivalente IgG), terwijl dat dit met de geselecteerde monovalente scFv/Fab antistoffragmenten verkregen met de 'phage display'-techniek pas kan nadat deze zijn omgezet in het uiteindelijke bivalente IgG-format.

Uiteraard zijn technische, wetenschappelijke en tijd en kosten bezwaren met elkaar verbonden en lastig uit elkaar te zien. Zoals genoemd in de tekst: "...de fabricage van goede humane antistof 'libraries' - een verzameling aan humane genen die coderen voor humane antistoffen, welke een essentiële stap vormt voor het uiteindelijk succes van 'phage display'...." vergt specifieke kennis, is een langdurig proces, en brengt hoge kosten met zich mee."

De reden van vermelden van de ethische bezwaren van Freund's adjuvant was dat het gebruik van het belastende Freund's adjuvant een vaak genoemd bezwaar was tegen in vivo immunisaties. Dit is verplaatst naar verfijning.

- 3.2 Doel: Het doel sluit niet aan bij wat u in 3.1 zegt; het is te ruim geformuleerd. Uw doel is het maken van een antistof, niet het ontwikkelen van nieuwe behandelingen. Het doel zou geformuleerd kunnen worden als: het maken/producen van therapeutisch-werkzame monoclonale antistoffen tegen nader te bepalen immuun gerelateerde targets. Dit is nu gewijzigd.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC vraagt zich af of altijd een combinatie van antigeen met het adjuvant Ribit wordt toegepast? Zo niet, dan dient een beslisboom in het projectvoorstel opgenomen te worden, waarbij u aangeeft welk antigeen wanneer in welk type adjuvant gaat, inclusief het daarbij te verwachten ongerief. De DEC wil graag zien of de combinatie van antigeen en adjuvant de beste match is (met het minst mogelijke ongerief).

Er zal altijd gebruik gemaakt worden van een adjuvant. In principe gebruiken we, door onze ervaring hiermee, het adjuvant Ribit (ook bekend als Sigma Adjuvant System). Eventueel, bij lage hoeveelheden beschikbaar antigeen, zal er mogelijk een ander olie-in-water emulsie gebruikt worden. In het Sigma Adjuvant System is er namelijk relatief veel antigeen nodig. Uitgebreide literatuur laat zien dat een adjuvant versterkend of zelfs noodzakelijk is voor de ontwikkeling van een antilichaam respons, vandaar dat we altijd gebruik zullen maken van de combinatie antigeen met adjuvant.

Bijlage 1

- Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Ook hier zegt u: "... met als doel om ziekten te behandelen en/of te bestuderen". De DEC constateert dat dit op meerdere

plekken in de aanvraag terugkomt. Om die reden verzoekt de DEC u de gehele aanvraag te herzien en helder weer te geven dat in deze studie niet de ziekte behandeld/bestudeerd wordt, maar dat antistoffen gemaakt worden waarmee ziekte behandeld kan worden.

Dit is nu verwijderd in deze tekst.

- B. De dieren: Hier noemt u dat er 12 immunisaties per jaar plaatsvinden. Het is niet helder waarop dit aantal is gebaseerd. Graag nader onderbouwen.

Dit is een aanname vanuit de opdrachtgever, XXX. Zij verwachten ongeveer 12 targets per jaar te willen starten. Dit wordt nu vermeld in de tekst.

- D. Vervanging, vermindering en verfijning: Zie de opmerking bij 3.1 over phage display. Graag ook hier toepassen.

Dit is nu vermeld in de tekst.

Niet Technische Samenvatting

- 3.1 Beschrijving doelstellingen: Ook hier dient het doel aangepast te worden. Na 'maken' kan een punt gezet worden en vervolgens kunt u, bijvoorbeeld, zeggen: '*Deze antistoffen worden door anderen gebruikt om ...*' etc. Tevens raadt de DEC u aan om in de tweede zin kan 'goed functionerend' te verwijderen.

Dit is nu gewijzigd in deze tekst.

- 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. Verschillende onderzoeksgroepen werken aan de ontwikkeling van nieuwe en meer specifieke therapieën voor diverse immuungerelateerde ziektebeelden, zoals reumatoïde artritis, multipele sclerose en kanker. Grote belangstelling gaat daarbij uit naar de zogenaamde immuuntherapie. Bij deze vorm van therapie wordt het immuunsysteem op de juiste plaats gestimuleerd dan wel afgeremd met

behulp van specifiek-functionele monoclonale antilichamen. Deze specificiteit kan leiden tot een betere werkzaamheid, grotere therapeutische index en kleinere kans op bijwerkingen. De productie van monoclonale antilichamen vereist kennis en kunde die niet alle onderzoeksgroepen in huis hebben. De aanvrager van dit project beschikt wel over deze kennis en kunde, en wil daarom met behulp van de experimenten die in de voorliggende projectaanvraag beschreven worden de komende jaren structureel – op verzoek van andere onderzoeksgroepen – monoclonale antilichamen maken.

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

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het maken van monoclonale antilichamen tegen nog nader te bepalen immuungerelateerde targets. Het uiteindelijke doel van het project is om met de productie van deze monoclonale antilichamen bij te dragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën tegen diverse immuungerelateerde ziektebeelden. Dergelijke therapieën kunnen door andere onderzoeksgroepen pas ontwikkeld worden wanneer deze kunnen beschikken over eerdergenoemde antilichamen. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de doelgroep (patiënten met immuungerelateerde ziektebeelden) en het onderzoeksveld. De morele waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: welzijn (gezondheid en stress) en rechtvaardigheid (intrinsieke waarde en integriteit). De morele waarden die voor de doelgroep worden bevorderd zijn: welzijn (kwaliteit van leven) en rechtvaardigheid (beschikbaarheid van effectieve en veilige therapieën).
6. Er is geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met de productie van monoclonale antilichamen met behulp van muizen, en heeft de kennis en faciliteiten die nodig zijn om de beschreven experimenten in de komende jaren routinematig uit te kunnen voeren. Om aan te geven wat de haalbaarheid is van de doelstellingen: immunisaties die in het verleden zijn uitgevoerd hebben monoclonale

antilichamen opgeleverd, waarvan de werkzaamheid momenteel in een klinische setting onderzocht wordt.

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 kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Voor elke immuungerelateerde target zal eenzelfde experiment uitgevoerd worden. Muisen worden eerst geïnjecteerd met het betreffende antigeen in combinatie met een geschikt adjuvans. Hierna volgen in een periode van enkele weken meerdere boosterinjecties met het antigeen (zonder adjuvans). Met behulp van meerdere bloedafnamen wordt de antilichaamtiter in de muizen gemonitord. Zodra deze hoog genoeg is wordt de betreffende muis geëuthanaseerd en worden zoveel mogelijk B-cellen uit de milt geïsoleerd. Daarna volgt een *ex vivo*-procedure – die buiten deze projectaanvraag valt – waarmee hybridomas gegenereerd worden: verschillende geselecteerde B-cellen worden geïmmortaliseerd door ze met myelomacellen te laten fuseren. Vervolgens wordt uit deze gegenereerde cellijnen de hybridoma geselecteerd die het gewenste antilichaam genereert. Criteria daarvoor zijn werkzaamheid (de gewenste biologische activiteit tegen de betreffende target) en veiligheid (geen kruisreactiviteit).

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor alle dieren in bijlage 1 wordt het cumulatieve ongerief ingeschat als matig. Dit ongerief is het gevolg van stress die gepaard gaat met het hanteren/fixeren van de dieren, van herhaaldelijke injecties en bloedafnamen, en van eventuele bijwerkingen van adjuvantia.

12. De integriteit van de dieren wordt aangetast door herhaaldelijke injecties en bloedafnamen (fysieke aantasting).
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Men houdt er rekening mee dat minder dan 5% van de dieren het humaan eindpunt bereikt. Daarbij gaat het om dieren waarbij het gebruikte adjuvans onverwacht ernstige bijwerkingen heeft, maar ook om de zogenaamde *non-responders*. Laatstgenoemde categorie dieren ondervindt niet meer dan matig ongerief, maar wordt voortijdig uit de proef genomen omdat de doelstelling van het experiment niet behaald kan worden.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De onderzoekers hebben in de projectaanvraag helder uiteengezet waarom men kiest voor de klassieke hybridomatechniek voor het maken van monoclonale antilichamen, en niet voor de nieuwe proefdiervrije techniek: de zogenaamde 'human antibody phage display' techniek. Een belangrijk argument hierbij is het gegeven dat laatstgenoemde techniek antilichamen oplevert die in principe gericht zijn tegen lichaamsvreemde/niet-humane antigenen. Dit in tegenstelling tot de klassieke hybridomatechniek, die antilichamen oplevert die gericht zijn tegen lichaamseigen/humane antigenen. En dat zijn juist de antilichamen die geschikt zijn voor de beoogde te ontwikkelen immunotherapieën. Daarnaast is het zo dat de klassieke hybridomatechniek alleen antilichamen oplevert die een hoge affiniteit hebben voor het betreffende antigeen. Bij de 'human antibody phage display' techniek is dit niet het geval, en moeten geselecteerde antilichamen nog een complex proces van affiniteitsmaturing ondergaan, voordat het de gewenste specifiek-functionele antilichamen zijn.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. De berekening van het benodigde aantal dieren is rechttoe rechtaan. Uit eerder uitgevoerde vergelijkbare experimenten is gebleken dat per immunisatie met een bepaald antigeen een groepsgrootte van drie muizen nodig is om voldoende monoclonale antilichamen te verkrijgen. Het totaal aantal benodigde dieren voor de duur van het hele project is gebaseerd op deze groepsgrootte, en op het aantal targets waarvoor andere onderzoeksgroepen antilichamen nodig hebben.
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. Door toepassing van andere adjuvantia dan het Complete Freund's adjuvant wordt het ongerief voor de dieren tot een minimum beperkt.

17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

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

19. De dieren worden in het kader van het project gedood, omdat de doelstellingen van het project alleen behaald kunnen worden door zoveel mogelijk (verschillende) B-cellen uit de milten van (geëuthanaseerde) muizen te isoleren. De dieren worden volgens een passende en in bijlage IV van de EU richtlijn genoemde methode gedood.

20. Omdat in het projectvoorstel muizen worden aangevraagd is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, gericht op het maken van monoclonale antilichamen tegen nog nader te bepalen immuungerelateerde targets, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.

2. Er vindt een aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met matig ongerief. Daar staat tegenover dat van dit project verwacht wordt dat het nieuwe monoclonale antilichamen oplevert, welke kunnen bijdragen aan belangrijke wetenschappelijke ontwikkelingen op het gebied van nieuwe immunotherapieën. De DEC kent daar veel gewicht aan toe. Op termijn kunnen deze nieuwe ontwikkelingen van substantieel belang zijn voor mensen met inflammatoire aandoeningen waar het immuunsysteem een rol speelt, zoals reumatoïde artritis, IBD, multiple sclerose, Alzheimer's, infectieuze ziekten als Ebola en veel soorten kanker, waarvoor nu geen geschikte therapie beschikbaar is.

Indien de hierboven genoemde doelstelling behaald wordt, dan zal dit project dus een reeks monoclonale antilichamen opleveren die specifiek-functioneel werkzaam zijn tegen bepaalde immuungerelateerde targets. Het is aannemelijk dat deze doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het maken van monoclonale antilichamen tegen nog nader te bepalen immuungerelateerde targets een substantieel belang vertegenwoordigt en dat dit substantiële belang opweegt tegen de aanzienlijke aantasting van

het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen, en daarbij als voorwaarde op te nemen dat de onderzoeker gedurende het project periodiek aan de CCD terugkoppelt welke antilichamen geproduceerd zijn.

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit 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
AVD108002017851
Bijlagen
1

Datum 6 maart 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 31 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Immunisaties ten behoeve van het verkrijgen van hybridomas" met aanvraagnummer AVD108002017851. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 28 februari 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek heeft u de criteria op basis waarvan u de targets selecteert verhelderd.

Beslissing

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

De algemene voorwaarde(n) zijn opgenomen op grond van artikel 1d lid 4, artikel 10a1 lid 2, artikel 10 lid 2 en/of artikel 10a3 van de wet.

Vanwege de ethische afweging stelt de CCD een specifieke voorwaarde betreffende het gebruik van andere dan in de aanvraag genoemde adjuvantia om het gebruik van adjuvantia in te kaderen en hiermee het ongerief voor de dieren te borgen. Om een goed beeld van de targets toegepast in uw project te houden, is een voorwaarde betreffende jaarlijkse terugkoppeling opgenomen.

U kunt met uw project "Immunisaties ten behoeve van het verkrijgen van hybridomas" starten. De vergunning wordt afgegeven van 6 maart 2017 tot en met 1 maart 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat De einddatum is anders dan u heeft aangevraagd, omdat een vergunning een maximale looptijd van 5 jaar kan hebben.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Datum:
6 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017851

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 24 januari 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

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).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
6 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017851



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Universiteit Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 6 maart 2017 tot en met 1 maart 2022, voor het project "Immunisaties ten behoeve van het verkrijgen van hybridomas" met aanvraagnummer AVD108002017851, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies. Er worden aanvullende voorwaarde(n) gesteld. Zie samenvatting De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 31 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 januari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 januari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 24 januari 2017, ontvangen op 31 januari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 28 februari 2017

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---------------------------------------|----------------------------------|---------------|---------------|-------------|
| 3.4.4.1 Immunisatie van muizen | | | | |
| | Muizen (<i>Mus musculus</i>) / | 180 | 100% Matig | |

Voorwaarden

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

Gedurende de looptijd van de vergunning, koppelt de aanvrager aan de CCD terug tegen welke antigenen antilichamen zijn geproduceerd, gebruik makend van welke adjuvantia en met welke doelstelling. 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 deze als vertrouwelijke informatie is geclassificeerd kunt u deze informatie buiten de rapportage houden

Aanvraagnummer:

AVD108002017851

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.

Andere adjuvantia dan genoemd in de aanvraag dienen vooraf te worden afgestemd met de IvD. Er mogen geen adjuvantie (stoffen die de immuunrespons stimuleren) gebruikt worden die hoger ongerief veroorzaken dan de in de bijlage genoemde voorbeelden van adjuvantia.



Aanvraagnummer:

AVD108002017851

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:

AVD108002017851

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. | document NTS 2017854 | 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 1 | | | x | | | | | | |
| 5 | Bijlage 2 | | | x | | | | | | |
| 6 | DEC advies | | | | x | | x | x | | |
| 7 | Advies CCD | | x | | | | | | | x |
| 8 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | | |

AVD 10500 2017 854



Centrale Commissie Dierproeven

1.

06 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 10500 <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>10500</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td>Rijksuniversiteit Groningen</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>1179037</td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>A. Deusinglaan 1, [REDACTED]</td></tr></table> | Naam instelling of organisatie | 10500 | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | Rijksuniversiteit Groningen | KvK-nummer | 1179037 | Straat en huisnummer | A. Deusinglaan 1, [REDACTED] | | | | | | | |
| Naam instelling of organisatie | 10500 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | Rijksuniversiteit Groningen | | | | | | | | | | | | | | | | |
| KvK-nummer | 1179037 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Straat en huisnummer | A. Deusinglaan 1, [REDACTED] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | <table><tr><td>Postbus</td><td></td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>9713 AV GRONINGEN</td></tr><tr><td>IBAN</td><td>NL45ABNA0474567206</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td>Rijksuniversiteit Groningen</td></tr></table> | Postbus | | Postcode en plaats | 9713 AV GRONINGEN | IBAN | NL45ABNA0474567206 | Tenaamstelling van het rekeningnummer | Rijksuniversiteit Groningen | | | | | | | |
| Postbus | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Postcode en plaats | 9713 AV GRONINGEN | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IBAN | NL45ABNA0474567206 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer | Rijksuniversiteit Groningen | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 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>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] | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1.5 | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker. | <table><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td></td><td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td></td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td></td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td></td><td></td></tr></table> | (Titel) Naam en voorletters | | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | Functie | | | Afdeling | | | Telefoonnummer | | | E-mailadres | | |
| (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?

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 - 3 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 3 - 2022 |

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Assessing the effect of antivirulence drugs in promoting clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in lung infection mouse model

- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Proefdierstudies in het kader van ontwikkelen van medicijnen voor het behandelen van *Pseudomonas aeruginosa* bacteriële infectie aan de luchtwegen

- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?

| | |
|-------------|------------------------------|
| Naam DEC | DEC-RUG |
| Postadres | A. Deusinglaan 1, [REDACTED] |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl |

4 Betaalgegevens


- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287 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 Groningen

Datum 02 - 02 - 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 (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.

Pseudomonas aeruginosa is a common pathogen in hospital-acquired infections, immuno-compromised, cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients. Especially in cystic fibrosis patients, the *P. aeruginosa* infections often become persistent and result in lifelong aggressive antibiotic

treatment. The major drawback of this particular approach is that the bacteria often develop resistance to the antibiotics. This can be caused by two mechanisms:

1. Resistance can be due to biofilm formation that protects the population of bacteria from antibiotics and the host's immune system.
2. Resistance can be due to development of intracellular escape mechanism to avoid the effects of the antibiotics.

During the progression of *P. aeruginosa* infection, multiple signaling systems (such as quorum sensing and iron-acquisition system) play an important role in regulating virulence factors production, swarming motility and biofilm maturation. Therefore, blocking these systems can attenuate the bacteria, and also destabilize biofilm formation, resulting in a fragile biofilm which makes the population more accessible to antibiotics and immune cells. The main advantage of this kind of approach is the fact that attenuating virulence (termed *antivirulence*), instead of killing pathogens, gives less pressure to develop resistance [1].

Our research group has been extensively studying antivirulence drugs, mainly for inhibition of quorum sensing system [2-5] and inhibition of iron-acquisition system (manuscript in preparation). The antivirulence drugs in our study can inhibit the target systems *in vitro* in *P. aeruginosa*, and resulted in reduced bacterial virulence. In addition, infection assays using nematode *Caenorhabditis elegans* and larvae of the great wax moth *Galleria mellonella* models showed that treatment with antivirulence drugs led to enhanced survival compared to controls. Furthermore, we have found that one of the most well-studied quorum sensing inhibitors in our library, [REDACTED], did not show toxicity in cell lines and in mouse.

For the purpose of testing the antivirulence drugs, we have developed a *P. aeruginosa* lung infection mouse model. This model is designed to generate a persistent infection with moderate severity. The pathological features of this model closely mimic the pathologic pattern associated with pulmonary infection in human. Therefore this model is suitable for studying the treatment for *P. aeruginosa* infection. A pilot study of [REDACTED] in the mouse model showed diminished infection and prolonged survival of the treated group compared to control.

Therefore, as the next step we would like to test whether these antivirulence drugs could promote the clearance of *P. aeruginosa* in the lung infection mouse model.

1. De Kievit, T. R. & Iglewski, B. H. *Infect. Immun.* **68**, 4839–4849 (2000).
2. Sio, C. F. *et al. Infect. Immun.* **74**, 1673–1682 (2006).
3. Papaioannou, E. *et al. Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 4891–4897 (2009).
4. Koch G, *et al. FEMS Microbiol Lett.* **356**, 62–70 (2014).
5. Koch G, *et al. PNAS*, **111(4)**:1568-1573 (2014).

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?

Targeting bacterial systems that regulate virulence factors production serves as an alternative strategy to overcome bacterial infections. Two major signaling system in *P. aeruginosa* that regulate virulence factors production, namely quorum sensing system and iron-acquisition system, are the most studied among Gram-negative pathogens. Considering high incidence of *P. aeruginosa* lung infection and its ability to gain resistance towards antibiotics, studying inhibition of these systems could pave the way for the development of novel therapy against *P. aeruginosa*.

We are currently studying 10 inhibitors for these systems *in vitro*, and so far, 8 of them are proven to be effective in attenuating *P. aeruginosa*. These 8 inhibitors (4 for each system) are consisting of large molecules (enzymes) or small molecules. To progress further in the research roadmap, we would like to test the efficacy from these inhibitors in the developed *P. aeruginosa* lung infection model in mouse.

Furthermore, since the interference with quorum sensing system or iron-acquisition system alters biofilm formation, we would also like to examine whether the antivirulence drugs enhance the sensitivity of *P. aeruginosa* to antibiotics. For this purpose, we will test the combination of the 8 inhibitors with 2 antibiotics that commonly used in the treatment of *P. aeruginosa* infection. These antibiotics are from different classes with distinctive mode of actions: disruption of the structural integrity of the bacteria, and interference of the DNA or protein metabolism in the bacteria. To achieve this purpose, the main goal is divided into 2 subgoals as follows:

Subgoal 1: Monitoring the drugs distribution in the lungs

The chosen administration route (intranasal) is a common method for delivering compounds into lungs. Showing a distribution of the antivirulence drugs and antibiotics in the lungs will be important to support the outcome of testing the efficacy of the drugs in the infection model. The antivirulence drugs or antibiotics will be tagged and visualized *in vivo*.

Subgoal 2: Assessing the efficacy of antivirulence drugs in *P. aeruginosa* lung infection model

This subgoal is designed to support the main purpose of this project, which is assessing the effect of each antivirulence drug (alone, or in combination with antibiotics) in the *P. aeruginosa* mouse infection model. To optimize the group size of animals, the pilot study will be performed, followed by a power analysis to determine the group size for a full efficacy study.

Our team consists of PIs, trained biotechnicians and PhD student who are experienced in these procedures. The study itself will be performed in the animal facility equipped with BSL-II laboratories and imaging devices. Supported by the previous findings and the expertise, we are positive in gaining a valuable result from this study.

3.3 Relevance

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

Pseudomonas aeruginosa infections are often difficult to treat due to the ability of the bacteria to develop resistance to antibiotics. As mentioned earlier, the resistance could be due to the biofilm formation that protects the bacterial population from antibiotics and the host's immune system. Inhibition of the systems that are important for this feature could enhance the bacterial susceptibility to the treatment. The use of antivirulence on its own, or to enhance the antibiotics effect, is a promising approach for future therapy. Until now, numerous quorum sensing inhibitors and iron-acquisition system inhibitors were characterized and were tested *in vitro*, and some *in vivo*. However developing this new approach faced many obstacles, for example, one of the most well studied quorum sensing inhibitor that is pre-clinically effective, presumably is too toxic for human use. Therefore, the research of antivirulence drugs have to be conducted thoroughly in order to increase the possibility of finding effective inhibitors that are safe for humans. When the proposed experiments are proven to be successful, the result will be a proof of concept that bridges our understanding of the efficacy of antivirulence drugs in mouse model. Furthermore, it will help us to design the next study in our roadmap, which is testing the drugs to a clinically relevant disease model of *P. aeruginosa* infections, e.g. cystic fibrosis or COPD.

3.4 Research strategy

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

The research strategy for testing the antivirulence drugs is depicted in Figure 1 (see below). The first stage of the project is the *in vitro* study: screening the effective inhibitors that can reduce virulence factors production in *P. aeruginosa*, and testing their interaction with the antibiotics. The efficacy of the inhibitors (alone or in combination with antibiotics) will be tested in the simple invertebrate infection model, such as *Caenorhabditis elegans* or the larvae of *Galleria mellonella*. Afterwards, the toxicity assay will be carried out in human epithelial lung cell lines model. The next stage of the project is *in vivo* study in a complex animal model. We have developed the *P. aeruginosa* lung infection model in mouse that closely mimics the pathologic pattern associated with pulmonary infection. The inhibitors that proven to be effective and non-toxic *in vitro* assays will be tested in this mouse model. This stage of the study is

the content of the proposed CCD application. The result of this study will be a proof of concept for the antivirulence efficacy, that will be investigated in a clinically relevant disease model in the future study.

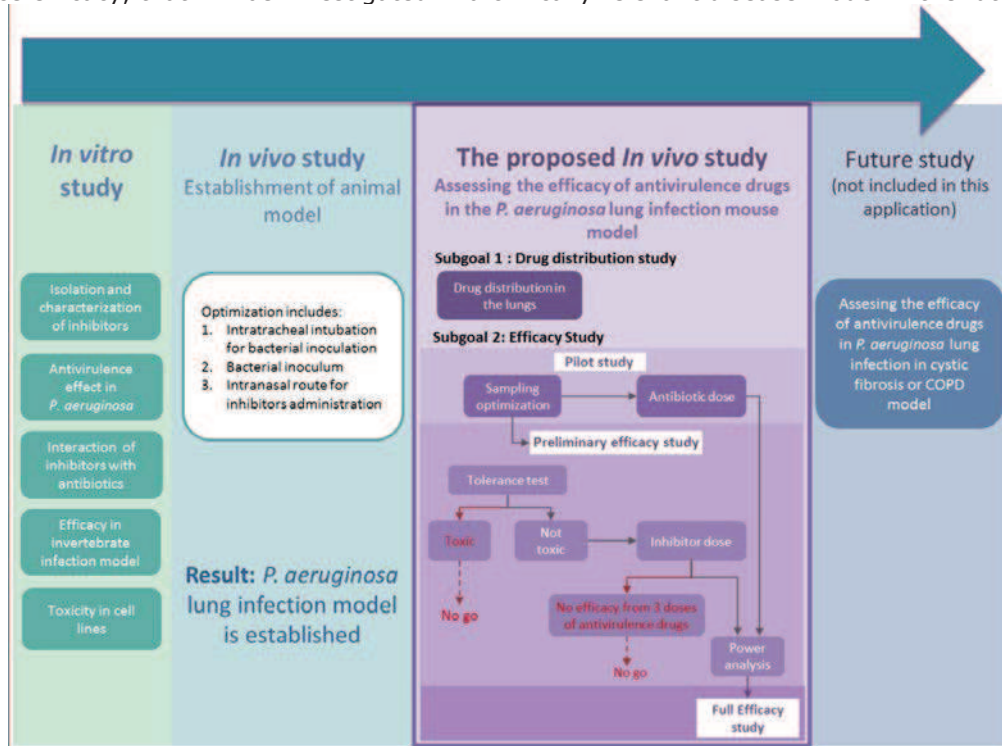


Figure 1. Roadmap of antivirulence drugs development

At this moment we are studying 10 inhibitors *in vitro*, and 8 (eight) most promising inhibitors were chosen for the subsequent *in vivo* study. The study itself is divided into 2 coherent subgoals that support each other: monitoring the drug distribution in the lungs and the efficacy study of the inhibitors. Hereby we elaborate these 2 subgoals that support the main goal in this proposed study:

Subgoal 1: Monitoring drugs distribution in the lungs

The chosen administration route (intranasal) is a common method for delivering compounds into lungs. Showing a distribution of the antivirulence drugs and antibiotics in the lungs will be important to support the outcome of testing the efficacy of the drugs in the infection model. The inhibitor or antibiotic will be coupled with an appropriate tag (for example fluorescent), and administered via intranasal route. Afterwards, the distribution of the compounds will be visualized.

This experiment will not be performed for a particular inhibitor if:

1. Another inhibitor with the same properties, molecular size, tagging method and identical route of administration has already been tested.

Subgoal 2: Assessing the efficacy of antivirulence drugs in *P. aeruginosa* lung infection model

This subgoal is designed to examine the efficacy of each inhibitor (alone or in combination with antibiotics) in the *P. aeruginosa* lung infection model. To optimize the group size of animals, a pilot study and preliminary efficacy study will be performed, followed by a power analysis to determine the required sample sizes for the full efficacy study.

2.1. Pilot study

The pilot study consists of 2 parts: optimization of the sampling frequency, and determination of minimum inhibitory concentration of the antibiotics.

A. Optimization of the sampling frequency

Several parameters must be analyzed from the isolated lungs to monitor the severity level of lung

infection, as follow:

- Bacterial count (the main parameter)
- Cytokine level
- Inflammation level (from histopathology)

In our mouse model, the infection is induced by administration of *P. aeruginosa* (t=0), followed by progression of infection until 4 days post inoculation (t=4). We will choose 3 most important time points that are sufficient to reflect the kinetics of these parameters during the course of infection. To do this, we will first follow the full kinetics of the sham group (infected animal treated with PBS) for 4 days. This experiment will determine the crucial time points to be used in the experimental setup for the whole study. Considering its importance, we have to be sure that the result is reproducible and reliable, before implementing the setup. Therefore, it is necessary to validate the result by performing one repetition of this experiment.

B. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotics

As mentioned earlier, 2 common antibiotics for treating *P. aeruginosa* infection will be used in the combination therapy, to examine whether the antivirulence drugs enhance the sensitivity of *P. aeruginosa* to antibiotics. In this stage, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotics will be determined. We will monitor the progression of infection in the treatment group (treatment with antibiotic) in comparison to the sham group (treatment with PBS). The maximum of 3 different doses will be tested, and 1 MIC dose will be use further in the full efficacy study.

The following studies: preliminary efficacy study and the full efficacy study are designed to test the efficacy of the inhibitor (alone or in combination with antibiotics).

2.2. Preliminary efficacy study

The preliminary efficacy study consists of 2 parts: testing tolerance of the animals to the antivirulence drugs, and determination of minimum effective dose of the antivirulence drug. Each dose will only be tested in one experiment (without repetition).

A. Drug tolerance test

To determine the tolerance of the animals to the inhibitor, various doses of the inhibitor will be given to the healthy animal. These doses are extrapolated from the *in vitro* study and invertebrate infection model, that we predicted as the effective doses for the mouse study. This experiment will give us data about the safe effective dose to be used in the subsequent stages.

B. Determination of minimum effective dose (MED) of the antivirulence drug

This stage is designed to find out the therapeutic window, and determine the minimum effective dose (MED) of the inhibitor (antivirulence drug) for the full efficacy study. We will monitor the progression of infection in the treatment group (treatment with inhibitor) in comparison to the sham group (treatment with PBS). Maximum 3 different doses of inhibitor will be tested to determine its efficacy, and the MED of the inhibitor will be chosen.

The animal experiment of a particular inhibitor will be terminated if:

1. The inhibitor is inducing toxicity.
2. Pilot study do not show efficacy of the inhibitor in the 3 tested doses.

2.3. Full efficacy study

Information from the pilot study will help us to do power analysis for determining the number of animals needed for the full efficacy study. This study is designed to find statistically significant differences between infected animals with and without treatment. One dose of inhibitor (MED), one dose of antibiotics (MIC) and the combination of thereof will be tested.

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

The project consists of two components that is formulated in two subgoals. For those purposes, we designed these set of procedures:

Procedure 1: Lung imaging for drug distribution study

This procedure is intended to achieve the subgoal 1 (Monitoring the drugs distribution in the lungs). The inhibitors or antibiotics will be coupled with an appropriate tag (for example fluorescent), and administered via intranasal route to the infected animals, at two different stages of lung infection. The procedure is a combination between:

- Inducing lung infection in mouse by delivering bacteria into the lungs via intratracheal route
- Single administration of the tagged drugs into the lungs via intranasal route, followed by visualization of drugs in the lungs.

Procedure 2: Lung infection model and antivirulence treatment development

This procedure is intended to achieve the subgoal 2 (Assessing the efficacy of antivirulence drugs in *P. aeruginosa* lung infection model). The procedure is a combination between:

- Inducing lung infection in mouse by delivering bacteria into the lungs via intratracheal route
- Daily administration of the drugs into the lungs via intranasal route

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.

Our main goal is to determine the efficacy of the antivirulence drugs in promoting clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in the mouse model. We have developed the *P. aeruginosa* lung infection model that is suitable for testing the antivirulence drugs. The coherence between each step in our proposal are summarized below:

1. Subgoal 1: monitoring the distribution of the drugs in the lungs will justify the outcome of the drug efficacy study.
2. Subgoal 2: is divided into different milestones to answer several important experimental conditions for assessing the efficacy. In the pilot study, we will determine the most crucial time points to be used as an experimental setup for the subsequent stages of the study. This setup will reduced the animal needed for all the following experiments. Furthermore, we will determine the minimum inhibition concentration (MIC) of the antibiotic that is suitable for the combination therapy. In the preliminary efficacy study, we will investigate the minimum effective dose (MED) for the antivirulence drugs. Altogether, the data from pilot and preliminary efficacy study will be applied for the setup in the full efficacy study where the group size is determined by power analysis.

We are currently studying 10 inhibitors for these systems *in vitro*, and so far, 8 of them are proven to be effective in attenuating *P. aeruginosa*. We estimated that each inhibitor will need approximately 6 months for animal testing. Therefore, the duration of 5 years that we proposed in this application is sufficient to study all 8 inhibitors.

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 | Lung imaging for drug distribution study |
| 2 | Lung infection model and treatment development |
| 3 | |
| 4 | |
| 5 | |
| 6 | |
| 7 | |
| 8 | |
| 9 | |



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|-------------------------------------------|
| 1 | Lung imaging for drugs distribution 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.

This procedure is designed to observe the distribution of antivirulence drugs or antibiotics in the lungs. The chosen administration route (intranasal) is a common method for delivering compounds into lungs. Showing a distribution of the antivirulence drugs and antibiotics in the lungs will be important to support the outcome of testing the efficacy of the drugs in the infection model. The distribution study will be performed at two different stages of lung infection: at the onset of infection, and at later stage of infection. The reason for this 2 time points is that the severity of the lung infection can influence the distribution of the drugs, due to the formed biofilm and the inflammation of the lungs. For this purpose, the procedure is divided into 2 parts:

1. Lung infection model (via intratracheal route)
Administration of *Pseudomonas aeruginosa* into the lungs to develop a persistent lung infection.

2. Delivery of the tagged drugs (via intranasal route) and imaging
Single delivery of the tagged antivirulence drugs and/or antibiotics (for example with fluorescent label) via intranasal route at certain stage of lung infection. The *in vivo* imaging will follow immediately after.

The anticipated primary outcome is a visual distribution of the compounds in the lungs. This data will help us to elucidate further the result from subgoal 2 (efficacy study).

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

In this procedure, we will infect the animals with *P. aeruginosa*, and study the drug distribution at the onset of infection, and at the later stage of infection. The infection procedure is identical with the established infection model in subgoal 2 (efficacy study). The bacteria will be inoculated to the mice (at $t=0$), and the infection is allowed to be developed for 4 days post inoculation ($t=4$).

Procedure:

P. aeruginosa that is embedded in agarose microbeads will be delivered into the mice via intratracheal administration. Disposable sterile intravenous catheters will be inserted into the trachea of the anesthetized mice, followed by instillation of 50 μ L bacterial suspension. While the animal is still under anaesthesia, a transponder microchip for temperature measurement will be implanted subcutaneously. This transponder allows us to measure the body temperature using a portable reader device by scanning the animal without a direct contact.

At $t=0$ or at $t=3$ (3 days post bacterial inoculation, at the peak of infection), a single administration of the tagged drugs or PBS will be delivered to the infected animals. From this point onwards, the procedures will be performed to the anesthetized animals. 50 μ L of the tagged drugs or PBS will be instilled dropwise into the nares of the animals. The *in vivo* imaging will be performed immediately after the drug administration. The animal will be placed into a Fluorescent Molecular Tomography (FMT) or In Vivo Imaging System (IVIS) instruments to determine the drug distribution in the lungs. All fluorescent intensities will be corrected for background fluorescence by subtracting with the fluorescent intensities from control mice. Afterwards, the animals will be terminated humanely to isolate the lungs for further analysis (immunostaining).

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

The proposed number of animals is based on the published study about delivery of large molecules to the lungs [1]. This number is sufficient to observe the reproducibility of the procedure. To optimize the number of animals, this experiment will not be performed for a particular inhibitor if another inhibitor with the same properties, molecular size, tagging method and identical route of administration has already been tested.

Reference

1. Tonnis WF. *et al. Eur J Pharm Biopharm. Elsevier B.V.*, **88**:1056–1063 (2014)

B. The animals

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

Specification of the animals: female BALB/C mouse, 12-13 weeks of age, minimum weight of 20 grams. This specification is identical with the infection model in our previous study, and the strain that will be used for the subgoal 2. BALB/C strain is one of the most preferred strains to work with *P. aeruginosa* infection [2,3]. Compared to other strains such as DBA/2, BALB/C mouse are susceptible to *P. aeruginosa* infections with lower mortality rate. With the same reason, female mice are chosen because they are more susceptible than males to infections [4].

To study the drug distribution, the experimental groups are divided as follow:

1. Drug distribution at the onset of infection ($t=0$)

- a. The tagged drug will be delivered immediately, followed by imaging (6 animals)
- b. As a control, PBS will be delivered immediately, followed by imaging. This group is intended as a control to adjust the background level during imaging procedure (3 animals)

2. Drug distribution at the later stage of infection ($t=3$)

- a. The tagged drug will be delivered immediately, followed by imaging (6 animals)
- b. As a control, PBS will be delivered immediately, followed by imaging. This group is intended as a control to adjust the background level during imaging procedure (3 animals)

Extra animals to cover the possibility of animal loss due to technical experimental errors (3 animals)

Total per drug: 21 animals

As mentioned earlier, the proposed number of animals is based on the published study [1], and allows us to observe the reproducibility of this method. At this moment we have 8 inhibitors and 2 antibiotics to be tested. Therefore, the maximum number of animals for this procedure is 210.

References

2. Bjarnsholt, T. et al. Microbiology **151**, 3873–3880 (2005).
3. Jakobsen, T. H. et al. Antimicrob. Agents Chemother. **56**, 2314–2325 (2012).
4. Guilbault, C. et al. Immunology. **107**, 297–305 (2002).

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

During drug development process, *in vivo* study is indispensable. To support the result of the efficacy study, we have to perform the distribution study using an identical drug administration method.

Replacement of animal with other system will not give an additional benefit to the study.

Reduction

The proposed number fulfils the requirement for drug distribution and for testing the reproducibility of this procedure. To optimize the number of animals, this experiment will not be performed for a particular inhibitor if another inhibitor with the same properties, molecular size, tagging method and identical route of administration has already been tested.

Refinement

We carefully designed our study to prevent unnecessary suffering and pain in the animals by taking several measures. The animals will be under anaesthesia during the whole procedure. The model is designed to develop a sublethal infection. In our previous study, the infection model resulted in moderate severity with no mortality from infection. However, we have to take into account the possible occurrence of outliers within the batch of animals even though inbred mouse strain will be used. Based on our previous experiments, we estimated the chance of reaching severe level of discomfort to be 15%. To reduce the incidence of progression into severe level, we will minimize the variation by managing the variables that we can control. We will always prepare bacterial inoculum from the same stock, and perform the standardized protocol to the healthy animals weighed more than 20 grams. Based on our previous findings, this specification helps in minimizing severity. To induce an infection, the bacteria is delivered only at the beginning of the experiment using intratracheal intubation, a non-surgical and less-invasive delivery method. This method caused less pain and suffering of the animals compared to other protocols that require tracheotomy or repetitive bacterial inoculation. In addition, to measure the body temperature, we will use a transponder microchip that implanted subcutaneously. This method allows us to measure the body temperature without inducing stress, compared to rectal thermometer. The decrease of body temperature correlates directly with the increasing severity of infection. Therefore, measuring body temperature, together with frequent monitoring of the animals' condition, will help us in avoiding implementation of humane endpoints.

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

The procedure will be performed to the anesthetized animal.

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 optimized procedures for this particular purpose have not been performed yet.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia will be applied according to the verified protocol. The anaesthesia equipment is checked regularly to ensure that the optimal procedure will be performed properly.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In our previous study, the infection model resulted in moderate severity with no mortality from infection. However, we have to take into account the possible occurrence of outliers within the batch of animals, even though inbred mouse strain will be used. Based on our previous experiments, we estimated the chance of reaching severe level of discomfort to be 15%. We expect that this incident is more likely to be occurred in the infected animals that will develop infection until 3 days post inoculation.

Explain why these effects may emerge.

Even though we will use inbred mouse strains, the response of each individual to the bacterial infection might differ.

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

To reduce the incidence of progression into severe level, we will minimize the controllable variation by always preparing bacterial inoculum from the same stock, and performing the standardized protocol to the healthy animals weighed more than 20 grams. Based on previous findings, this specification helps in minimizing severity. We will frequently monitor the animals' condition to avoid humane endpoints to be implemented.

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.

Severe change in general appearance (constant piloerection, inactivity, poor ambulation) and non-transient hypothermia.

Indicate the likely incidence.

As mentioned earlier, in our previous study, the infection model resulted in moderate severity with no mortality from infection. Taken into account the possible occurrence of outliers within the batch of animals, we estimated the chance of reaching severe level of discomfort to be 15%. We expect that this incident is more likely to be occurred in the infected animals that will develop infection until 3 days post inoculation. We will frequently monitor the animals condition to avoid humane endpoints to be implemented.

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').

We estimated 15% of the infected animals that will develop infection until 3 days post inoculation could reach severe level of discomfort, and the rest will be classified into moderate. Therefore, we categorized the discomfort level of this procedure as moderate to severe.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

We need to isolate the lungs for further analysis such as immunostaining.

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 |
|---------------|------------------------------------------------|
| 2 | Lung infection model and treatment development |

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 procedure is a combination between inducing the lung infection and delivery of antivirulence drugs (alone or in combination with antibiotics). The method has been optimized in the previous animal experiment.

1. Lung infection model (via intratracheal route)

Administration of *Pseudomonas aeruginosa* into the lungs to develop a persistent lung infection.

2. Delivery of drugs (via intranasal route)

Delivering the antivirulence drugs and/or antibiotics to the site of infection in order to assess the efficacy of the drugs in the lung infection model.

The anticipated primary outcome is the progression of infection, or the clearance of bacteria from the lungs. We expect that the latter will be achieved when the infected animals are treated with antivirulence drugs, and more pronounce when combined with antibiotics. Experimental data from the isolated lungs (bacterial count, cytokine level, and inflammation level from histopathology) will be collected to evaluate the drugs' efficacy.

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

The methods described below have been optimized, resulted in a persistent infection with moderate severity and an estimate of 15% chance of progression to severe level.

Procedure:

P. aeruginosa that is embedded in agarose microbeads will be delivered into the mice via intratracheal administration. Disposable sterile intravenous catheters will be inserted into the trachea of the anesthetized mice, followed by instillation of 50 µL bacterial suspension. While the animal is still under anaesthesia, a transponder microchip for temperature measurement will be implanted subcutaneously. This transponder allows us to measure the body temperature using a portable reader device by scanning the animal without direct contact. Bacterial administration will only be performed once at the start of the experiment (t=0). The progression of infection will be followed until 4 days post inoculation (t=4).

The antivirulence drugs and/or antibiotics in a liquid formulation will be delivered once daily during the course of infection. 50 µL of the drugs or PBS will be instilled dropwise into the nares of the anesthetized animal.

The progression of infection will be monitored by observing the general appearance (body weight, body temperature, coat condition and behaviour) and analysing the lungs at different time points. Animals (randomly chosen) will be sacrificed each day to analyse the bacterial load, cytokine level and inflammation of the lungs.

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

To optimize the number of animals, the pilot study will be performed, followed by a power analysis for a full efficacy study. In this way, we will avoid using excessive number of animals and optimize the use of animals in each experiment. The number of animals in the pilot study is determined from the literature and our previous study. The group size is adjusted to overcome the different responses from each individual animal to the bacterial infection. The statistical analyses will consist of a Student's t test (for normally distributed data) or Mann Whitney U (non-normally distributed data) when two groups are compared. Power analyses will be calculated using G*Power [1].

1. Faul F, *et al.* Behavior Research Methods **39**, 175-191 (2007)

B. The animals

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

Specification of the animals: female BALB/C mouse, 12-13 weeks of age, minimum weight of 20 grams. BALB/C strain is one of the most preferred strains to work with *P. aeruginosa* infection [2,3]. Compared to other strains such as DBA/2, BALB/C mice are susceptible to *P. aeruginosa* infections with lower mortality rate. With the same reason, female mice are chosen because they are more susceptible than males to infections [4]. This specification is identical with the infection model in our previous study.

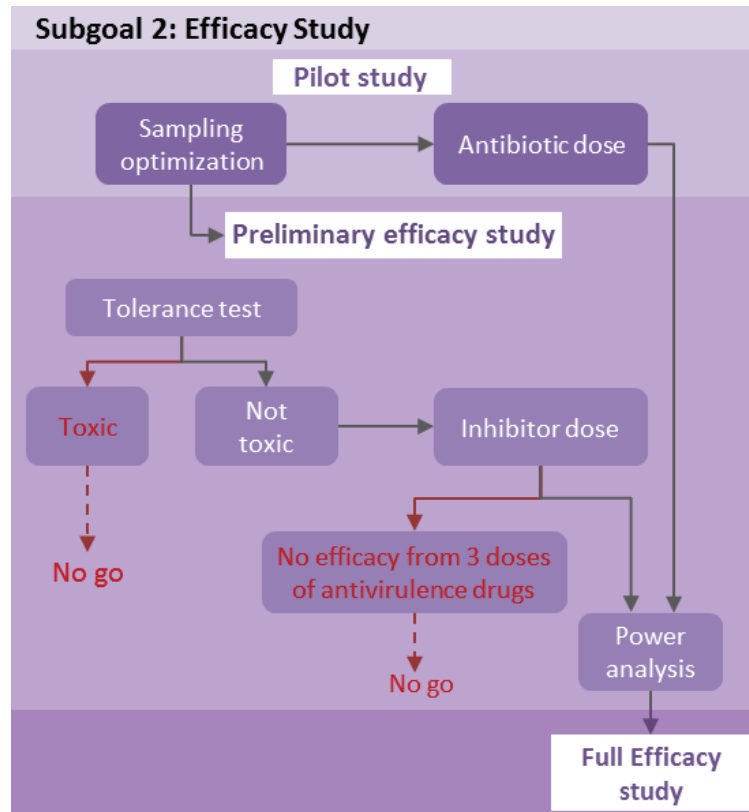


Figure 1. The order of experiments of subgoal 2 (efficacy study)

The order of experiment in this subgoal is depicted in Figure 1. To optimize the group size of animals, a pilot study and preliminary efficacy study will be performed, followed by a power analysis to determine the required sample sizes for the full efficacy study. The explanation of animals needed for each antivirulence drug (alone and in combination with antibiotics) will be elaborated below. This number includes: treatment group with proper control groups and experiments to determine therapeutic doses.

1. Pilot study

The pilot study consists of 2 parts: optimization of the sampling frequency, and determination of minimum inhibitory concentration of the antibiotics.

A. Optimization of the sampling frequency. Total: 94 animals (2 experiments, each 47 animals)

Several parameters must be analyzed from the isolated lungs to monitor the severity level of lung infection, as follow:

- Bacterial count (the main parameter)
- Cytokine level
- Inflammation level (from histopathology)

Due to different responses from each individual animal to the bacterial infection, 6 animals is the minimum number for bacterial count analysis at each time point; and 3 animals will be sacrificed for histopathology analysis.

In our mouse model, the infection is induced by the administration of *P. aeruginosa* ($t=0$), followed by progression of infection until 4 days post inoculation ($t=4$). We will choose 3 most important time points that are sufficient to reflect the kinetics of these parameters during the course of infection. To do this, we will first follow the full kinetics of the sham group (infected animal treated with PBS) for 4 days. One most crucial time points is $t=0$, to confirm the amount of bacteria that is inoculated to the animals. The other 2 time points will be named as $t=a$ and $t=b$ at the time being. The chosen time points will be the experimental design for the subsequent stages.

The number of animals needed for one experiment is depicted in Table 1. This experiment will determine the crucial time points to be used in the experimental setup for the whole study. Considering its importance, we have to be sure that the result is reproducible and reliable, before implementing the setup. Therefore, it is necessary to validate the result by performing one repetition of this experiment.

Table 1. Group size for optimization of the sampling frequency

| Time points | t=0 | t=1 | t=2 | t=3 | t=4 | Total |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|
| Analysis | | | | | | |
| Bacteria count and cytokine level | 6 animals | 6 animals | 6 animals | 6 animals | 6 animals | 42 animals |
| Histopathology | | 3 animals | 3 animals | 3 animals | 3 animals | |

Extra animals to cover the possibility of animal loss due to technical experimental error (5 animals per experiment. Total: 10 animals)

B. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotics. Total 130 animals per inhibitor

Two antibiotics that are commonly used for treating *P. aeruginosa* infection will be used in the combination therapy, to examine whether the antivirulence drugs enhance the sensitivity of *P. aeruginosa* to antibiotics. These antibiotics are from different classes with distinctive mode of actions: disruption of the structural integrity of the bacteria, and interference of the DNA or protein metabolism in the bacteria. In this stage, the minimum inhibitory concentration (MIC) of the antibiotics will be determined. The maximum of 3 doses will be tested based on *in vitro* assays, and the MIC dose will be used further in the full efficacy study.

Extrapolation into the *in vivo* model is challenging, therefore, we designed the experiments to increase the chance of getting the correct MIC. In the first experiment, we will test 2 doses simultaneously to determine the effective range. Then, when necessary, an additional experiment for testing 1 extra dose will be performed. This approach reduces the needed control group, in comparison to testing only single dose three times. While testing 3 doses simultaneously will increase the chance of getting the correct MIC, when none of the doses was effective, more experiment(s) must be performed.

The number of animals needed for each group is depicted in Table 2. The experimental groups are as follow:

- Group 1: Infected animals receiving antibiotic (Experiment 1: 2 doses, each 24 animals; Experiment 2: 1 dose, each 24 animals. Total: 72 animals)
- Sham group: Infected animals receiving PBS (Experiment 1: 24 animals; Experiment 2: 24 animals. Total: 48 animals)
- Extra animals to cover the possibility of animal loss due to technical experimental error (5 animals per experiment. Total: 10 animals)

Table 2. Group size for determination of MIC of antibiotic and MED for antivirulence drugs

| Time points | t=0 | t=a | t=b | Total |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|--------------|
| Analysis | | | | |
| Bacteria count and cytokine level | 6 animals | 6 animals | 6 animals | 24 animals |
| Histopathology | | 3 animals | 3 animals | |

Extra animals to cover the possibility of animal loss due to technical experimental error (5 animals)

The following studies: preliminary efficacy study and the full efficacy study are designed to test the efficacy of the inhibitor (alone or in combination with antibiotics).

2. Preliminary efficacy study

The preliminary efficacy study consists of 2 parts: testing tolerance of the animals to the antivirulence drugs, and determination of minimum effective dose of the antivirulence drug. Each dose will only be tested in one experiment (without repetition).

A. Drug tolerance test (Total 12 animals)

To determine the tolerance of the animals to the inhibitor, 3 doses of inhibitor will be given to the healthy animal via intranasal route. These doses are extrapolated from the *in vitro* study and invertebrate infection model, that we predicted as the effective doses for the mouse study. The inhibitors will be given from t=0 to t=4, and the reaction of the animals to the drugs will be monitored. This experiment will give us data about the safe effective dose to be used in the subsequent stages.

The experimental groups are as follow:

- Group 1: Animals receiving daily administration of inhibitor. 3 doses, each 3 animals. (Total: 9 animals)
- Sham group: Animals receiving daily administration of PBS (Total: 3 animals)

B. Determination of minimum effective dose (MED) of the antivirulence drug. Maximum 130 animals per inhibitor

This stage is designed to find out the therapeutic window, and determine the minimum effective dose (MED) of the inhibitor (antivirulence drug) for the full efficacy study. We will monitor the progression of infection in the treatment group (treated with inhibitor) in comparison to the sham group (treated with PBS). Maximum 3 different doses of inhibitor will be tested to determine its efficacy, and the MED of the inhibitor will be chosen.

Using a similar approach as determination of MIC of antibiotics, we will determine the MED by testing 2 doses in the first experiment, and when necessary, the second experiment of testing 1 extra dose will be performed.

The number of animals needed for each group is depicted in Table 2 above. The experimental groups are as follow:

- Group 1: Infected animals receiving inhibitor (Experiment 1: 2 doses, each 24 animals; Experiment 2: 1 dose, each 24 animals. Total: 72 animals)
- Sham group: Infected animals receiving PBS (Experiment 1: 24 animals; Experiment 2: 24 animals. Total: 48 animals)
- Extra animals to cover the possibility of animal loss due to technical experimental error (5 animals per experiment. Total: 10 animals)

3. Full efficacy study. Total: 190 animals per inhibitor

Information from the pilot and preliminary efficacy study will help us determine the number of animals needed for the full efficacy study. This study is designed to find statistically significant treatment effect. The actual group size will be determined from power analysis. However, at this moment we estimated for 30 animals per group based on literature study (Table 3). One dose of inhibitor (MED), one dose of antibiotics (MIC) and the combination of thereof will be compared to the control group. The experimental groups for each inhibitor are as follows:

- Group 1: Infected animals receiving antivirulence drug (1 MED, total: 30 animals)
- Group 2: A. Infected animals receiving antibiotic A (1 MIC dose, total: 30 animals)
B. Infected animals receiving antibiotic B (1 MIC dose, total: 30 animals)
- Group 3: A. Infected animals receiving antivirulence drug and antibiotic A (1 combination, total: 30 animals)
B. Infected animals receiving antivirulence drug and antibiotic B (1 combination, total: 30 animals)
- Group 4: Infected animals receiving PBS (as a control for each experiment, total: 30 animals)
- Extra animals to cover the possibility of animal loss due to technical experimental error (10 animals)

Table 3. Group size for full efficacy study

| Time points | t=0 | t=a | t=b | Total |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|--------------|
| Analysis | | | | |
| Bacteria count and cytokine level | 6 animals | 10 animals | 10 animals | 30 animals |
| Histopathology | | 2 animals | 2 animals | |

At this moment we have 8 inhibitors and 2 antibiotics to be tested. These inhibitors are classified as antivirulence drugs, consisting of large molecules (enzymes) and small molecules. For testing each inhibitor (alone and with combination of antibiotic), we proposed 3010 animals (Table 4).

Table 4. Calculation of the proposed animals

| Experiment | | Group size | Frequency of experiment | Total number of animals |
|----------------------------|-------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| Pilot study | A. Optimization of the sampling frequency | 94 | 1x, at the beginning of the study | 94 |
| | B. Antibiotics dose | 130 | For 2 antibiotics | 260 |
| Preliminary efficacy study | A. Drug tolerance test | 12 | For 8 inhibitors | 96 |
| | B. Inhibitor dose | 130 | For 8 inhibitors | 1040 |
| Full efficacy study | Full efficacy study | 190 | For 8 inhibitors | 1520 |
| TOTAL | | | | 3010 |

References

2. Bjarnsholt, T. et al. Microbiology **151**, 3873–3880 (2005).
3. Jakobsen, T. H. et al. Antimicrob. Agents Chemother. **56**, 2314–2325 (2012).
4. Guilbault, C. et al. Immunology. **107**, 297–305 (2002)

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

During drug development process, *in vivo* study is indispensable. Although the effect of the antivirulence drugs have been investigated in invertebrate model, the therapeutic efficacy has to be studied in a complex animal. Mouse is the preferred animal to perform these studies, given similarities in anatomy, physiology and the immune system of humans. Hence, various infection models have been developed in this animal, including acute and chronic *P. aeruginosa* infection which show a comparable pathogenesis as observed in human. In addition, the availability of reagents and a working protocol in developing *P. aeruginosa* lung infection in mice for the antivirulence study, strengthens the decision of choosing mouse as a model in our research.

Reduction

We optimize the number of animals by determining the most important time points for sampling in the course of infection. In addition, preliminary study will be performed followed by a power analysis for a full efficacy study. In this way, we will avoid using excessive number of animals and optimize the use of animals in each experiment. The number of animals in pilot experiment was determined from literature study, which fulfill the minimum requirement to analyze the important parameters for monitoring lung infection.

Refinement

We carefully designed our study to prevent unnecessary suffering and pain in the animals by taking several measures. The animals will be under anaesthesia during the whole procedure. The model is designed to develop a sublethal infection. In our previous study, the infection model resulted in moderate severity with no mortality from infection. However, we have to take into account the possible occurrence of outliers within the batch of animals even though inbred mouse strain will be used. Based on our previous experiments, we estimated the chance of reaching severe level of discomfort to be 15%. To reduce the incidence of progression into severe level, we will minimize the variation by managing the variables that we can control. We will always prepare bacterial inoculum from the same stock, and perform the standardized protocol to the healthy animals weighed more than 20 grams. Based on our previous findings, this specification helps in minimizing severity. To induce an infection, the bacterial inoculum is delivered only at the beginning of the experiment using a non-surgical and less-invasive delivery method (intratracheal intubation). This method caused less pain and suffering of the animals compared to other protocols that require tracheotomy or repetitive bacterial inoculation. Another measure is to limit the duration of the study into 4 days post bacterial inoculation. This duration is sufficient for our study, hence it is not necessary to prolong the infection period. In addition, to measure the body temperature, we will use a transponder microchip for temperature measurement that implanted subcutaneously. This method allows us to measure the body temperature without inducing stress, compared to rectal thermometer. The decrease of body temperature correlates directly with the increasing severity of infection. Therefore, measuring body temperature, together with frequent monitoring of the animals' condition, will help us in avoiding implementation of humane endpoints.

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

The procedures will be performed to the anaesthetized animals.

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 optimized procedures for this particular purpose have not been performed yet.

Accommodation and care**F. Accommodation and care**

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Anaesthesia will be applied according to the verified protocol. The anaesthesia equipment is checked regularly to ensure that the optimal procedure will be performed properly.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In our previous study, the infection model resulted in moderate severity with no mortality from infection. However, we have to take into account the possible occurrence of outliers within the batch of animals, even though inbred mouse strain will be used. Based on our previous experiments, we estimated the chance of reaching severe level of discomfort to be 15%.

Explain why these effects may emerge.

Even though we will use inbred mouse strains, the response of each individual to the bacterial infection might differ.

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

To reduce the incidence of progression into severe level, we will minimize the variation by managing the variables that we can control. We will always preparing bacterial inoculum from the same stock, and performing the standardized protocol to the healthy animals weighed more than 20 grams. Based on our previous findings, this specification helps in minimizing severity. We will frequently monitor the animals' condition to avoid humane endpoints to be implemented.

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.

Severe change in general appearance (constant piloerection, inactivity, poor ambulation) and non-transient hypothermia.

Indicate the likely incidence.

As mentioned earlier, in our previous study, the infection model resulted in moderate severity with no mortality from infection. Taken into account the possible occurrence of outliers within the batch of animals, we estimated the chance of reaching severe level of discomfort to be 15%. We will frequently monitor the animals condition to avoid humane endpoints to be implemented.

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').

We estimated 15% of the infected animals could reach severe level of discomfort, and the rest will be classified into moderate. However, the severity will be lower when the treatment is proven to be effective. Therefore, we categorized the discomfort level of this procedure as moderate to severe.

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.

Lungs and other organs, as well as blood are needed to be analysed for measuring the infection progression.

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

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: Interne RUG code **8078**
2. Titel van het project: **Assessing the effect of antivirulence drugs in promoting clearance of Pseudomonas aeruginosa in lung infection mouse model**
3. Titel van de NTS: **Proefdierstudies in het kader van ontwikkelen van medicijnen voor het behandelen van Pseudomonas aeruginosa bacteriële infectie aan de luchtwegen**
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: **07-12-2016**
 - aanvraag compleet: **07-12-2016**
 - in vergadering besproken: **15-12-2016**
 - anderszins behandeld: **26-01-2016**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **19-12-2016 tot 13-01-2017**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **13-01-2017**
 - advies aan CCD: **02-02-2017**
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: **16-12-2016**

Gestelde vraag/vragen:

1/ In the application you state that you wish to replicate the majority of the experiments. What is the rationale for this? Can you clearly substantiate why replication of the experiments (by your own research group) is absolutely necessary?

2/ In the application you state that you will use an established animal model. Can you substantiate this? Previous information (amendments in DAP) indicate that setting up the model was troublesome.

3/ Progression to severe discomfort in 30% of the animals is rather severe. Are options available to reduce severe discomfort? The DEC stresses that, if severe discomfort is reached in so many animals, that a proper and extensive justification for this needs to be given

4/ A proper scientific justification for using female mice only should be provided

Relating to appendix 1:

5/ A (technical) description of how the imaging (using radioactive or fluorescent probes) in lungs is performed is lacking.

Relating to appendix 2:

6/ It is unclear how the used antibiotic is selected. Two candidate antibiotics are mentioned but it appears from the indicated number of animals that only 1 of the 2 is used. Can you clarify this?

7/ It is unclear why experiment preliminary 'C. Combination therapy of antivirulence drug and antibiotic' is needed. The MIC and MED dose have been established in the previous experiments. Would these data not provide estimate for the effect of combined therapy. Also, is it possible to get information on possible effects of interaction between treatment modalities from in vitro assays?

Relating to NTS:

8/ There are discrepancies in number of animals and level of discomfort when comparing NTS with the project proposal/ appendixes. The level of discomfort should really reflect the description as mentioned in the proposal, including the (estimated) proportion of animals that undergo the different levels of discomfort

- Datum antwoord: 13-01-2017

- Verstrekt(e) antwoord(en):

1/ In our initial CCD application, the repetition was assigned only for the "optimization of the sampling frequency" in the Pilot Study, and for the Full Efficacy Study. Our intention was to verify the reproducibility of the experimental results to ensure that the results are scientifically reliable. The "optimization of the sampling frequency" is an important step, because it will determine the crucial time points to be used in the experimental setup for the whole study. We have to be sure that the result is reproducible and reliable, before implementing the setup. Therefore, it is necessary to validate the result by performing a repetition of this experiment. In the case of Full Efficacy study, we agreed to exclude the repetition and will perform the experiment once. We are convinced that performing one full set of experiment with statistical support is sufficient to determine the treatment effect. The overview of the proposed study is as follows:

1. Pilot study – will only be performed at the beginning of the study: A. Optimization of the sampling frequency (one repetition to confirm the reproducibility); B. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the antibiotics (testing maximum of 3 doses). 2. Preliminary study – will be performed for all inhibitors: A. Drug tolerance test (testing 3 doses); B. Determination of minimum effective dose (MED) of the inhibitors (testing maximum of 3 doses). 3. Full efficacy study – Testing of MIC, MED and combination of thereof, where the group size is determined by power analysis.

Modifications were made in: Proposal and Appendix 2

2/ We understand that the word "established" in the application gives a strong impression of the animal model, which is not applicable in our case. We would like to explain that at this point, we have an optimized working protocol for inducing *P. aeruginosa* lung infection that give a sufficient outcome for our purpose. The explanation of the model development is elaborated below. Lung infection model is challenging to be performed, but it shows a great importance as a robust system for studying drug development and disease pathology. The model itself was established by other research groups around the world, but our study initiated the first step of establishing this model in the UMCG-RuG facility. Acquiring this model will permit a continuous research in our facility, as designed in our roadmap of drug development process. We started the study with the well-planned strategy, but challenges and difficulties are inevitable, and in some cases are unforeseeable during the setting up of this model. The development of animal model in our study was planned carefully and the experiments were executed in a stepwise manner. We strive to refine the conventional infection protocol with a less invasive bacterial administration method (non-surgical intratracheal intubation to replace tracheotomy). To facilitate the need of delivering large molecule inhibitors, we chose an intranasal administration method. To the best of our knowledge, there is no published article with this particular method combination. The lack of references also contributed to the rather complicated optimization process that we experienced. We have optimized important variables to develop the lung infection model. First of all, the bacterial inoculum has to be prepared in a certain way, so that a

single bacterial administration to the lungs is sufficient to induce a persistent infection. In order to achieve this, the bacteria have to be entrapped in agarose microbeads before administration to the lungs. We have validated the bacterial entrapment protocol, which resulted in a consistent beads size (100-200 μm) and a consistent bacterial count ($1\text{-}3 \times 10^8$ CFU/mL). The microbeads suspension was subsequently diluted to the desired bacterial CFU for administration to the animals. We have confirmed that the lung administration of sterile agarose microbeads alone (without *P. aeruginosa*) do not affect the animals' health. Next, we have to solve one of the most crucial aspects in generating the model, which is determining the bacterial dose to be inoculated. Inoculating too less bacteria leads to a rapid clearance of infection, while inoculating too much bacteria is associated with severe infection and high mortality. Therefore, we intended to find the sublethal dose, that will induce a persistence infection with low mortality. Each research group in the literatures mentions different sublethal doses of bacteria. Although each group is using the same bacterial strain that was obtained from the same source, there is variation in culturing the bacteria at each laboratory. This variation inevitably creates diverse bacterial sublines that are associated with different fitness, antimicrobial susceptibility, and virulence. Therefore, determining the sublethal dose for infection was not a straightforward translation from the literature.

In the last experiments to optimize the animal model setup, we have finally determined the sublethal dose for infection, which is $2,5 \cdot 10^5$ CFU/animal. The animals also received PBS via intranasal route once daily, to simulate the condition of the intended drug administration. Two independent experiments with each 6 animals resulted in a persistent infection up to 4 days post bacterial inoculation, as seen in the bacterial loads in the lungs (Figure 1). No mortality observed during the experiment, and the infection resulted in a moderate severity, judged by the change in body temperature and body weight (Figure 2), as well as the general appearance (behavior, movement and coat condition). The repetition of this protocol resulted in the same trend in all monitored parameters as can be seen in the results. Therefore, this optimized protocol is assigned as the method to generate the lung infection model for further experiment.

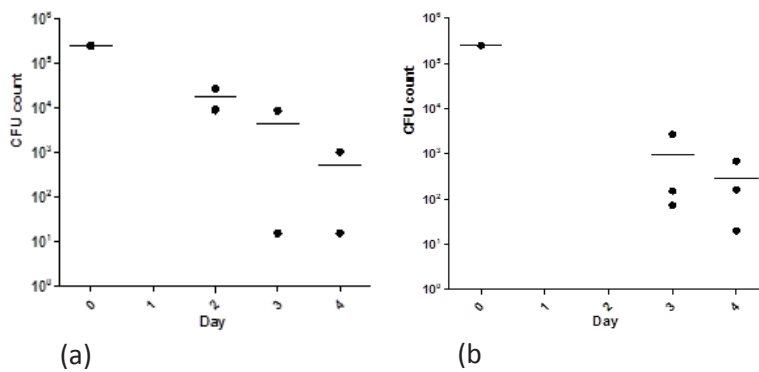


Figure 1. Bacterial count kinetics in the lungs of the animals infected with sublethal bacterial dose. The results are from two independent experiments (a and b). To reduce the animal numbers, no animals were sacrificed at Day 0, the inoculated bacterial counts were confirmed by plating the inoculum on agar plates. In addition, based on previous experiments, the amount of bacteria in the lungs at $t=0$ was the same as the administered inoculum. • individual CFU values, line intercepts mean.

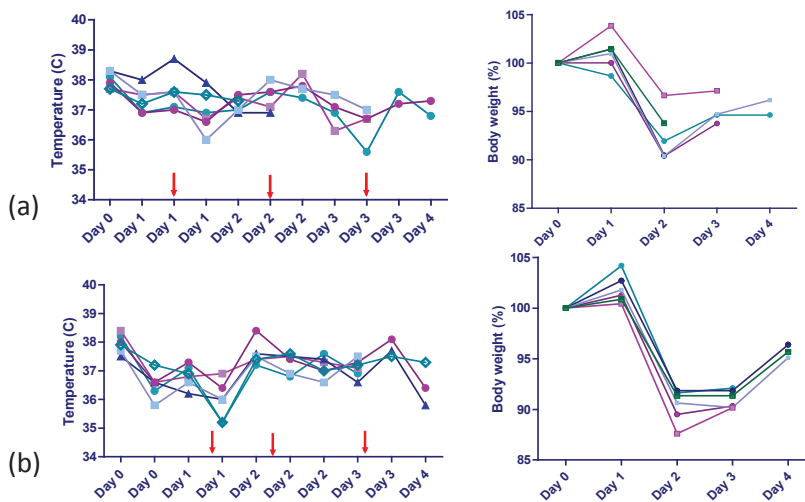


Figure 2. Change of body weight and body temperature of the animals infected with sublethal bacterial dose. The results are from two independent experiments (a and b). Each individual line corresponds to one animal. The red arrows indicate the intranasal administration of PBS. We observed no permanent hypothermia, and the animals gained weight in Day 3.

3/ As mentioned in the response to question no. 2, in reality we did not observe a severe infection nor the mortality from infection when performing the latest protocol. We exaggerated the severity level of the model in the proposal to anticipate the possibility of higher variance of severity when using a larger number of animals. Although the inbred mouse strain will be used, we have to take into account the possible occurrence of outliers within the batch of animals. Therefore, to make a more representative estimation, we would formulate the chance of reaching severe level of discomfort based on the experimental data, which is 15% chance (in the case that 1 animal reaching severe level of discomfort in a group of 6 animals).

Modifications were made in: Appendix 1 and Appendix 2

4/ Justification of using female mice was made in the application.

Modifications were made in: Appendix 1 and Appendix 2

5/ Based on the progress in screening the inhibitor candidates, we have decided that the radioactive tagging will not be necessary at this point. The fluorescence tag is sufficient for our purpose to perform the distribution study.

Modifications were made in: Proposal and Appendix 1

6/ Two antibiotic candidates in this study are commonly used for treating *Pseudomonas aeruginosa* infection. They are selected from different antibiotics classes with distinctive mode of actions: disruption of the structural integrity of the bacteria, and interference of the DNA or protein metabolism in the bacteria. What we implied in the initial application was to test the combination between 4 antivirulence drugs with the first antibiotic, and 4 other antivirulence drugs with the second antibiotic. We were aware that this strategy relinquishes some important combinations, and missing the chance to have a complete answer for the research question. Although we had a solid argument to propose for all drugs combinations, the sole reason for the initial design was to reduce the proposed number of animals. We were afraid that the complete study design resulted in too much animals and halt the application process. We now aware that this is not an ethical reason to minimize the proposed number of animals. Therefore in this revision, we would like to modify the application by incorporating all possible combinations between antivirulence drugs and antibiotics. Since the chosen antibiotics attack different pathway in the bacteria, it is intriguing to see if our antivirulence drugs could work in synergy with these antibiotics. This approach will give a more comprehensive answer to the research questions.

A certain drug combination will be tested in the animal model only when these 2 conditions are addressed:

1. The combination of antivirulence and antibiotic show no negative interaction in vitro.
2. The combination of antivirulence and antibiotic show synergistic effect in the invertebrate animal model.

Modifications were made in: Proposal and Appendix 2

7/ Prior to the full efficacy study, an in vitro assay will be performed, to eliminate the combination(s) of antivirulence and antibiotics that show negative interaction(s). Further, the drugs combinations without negative interactions will be tested for its synergistic effect in the invertebrate infection model. These together will give an indication whether the combination therapy will be continued to the Full Efficacy Study.

In our initial strategy, the reason why we want to do the preliminary combination study is to make a stepwise approach. Based on the further discussion with a statistician and the advice from DEC, we will remove the drug combination test in the Preliminary Study, and will perform it directly in the Full Efficacy Study. We expect that the combination therapy will show a more pronounce, or the same level of therapeutic effect as antibiotic or antivirulence drug alone. Hence, we can use the MED and the MIC data for the power analysis to determine the group size for the combination therapy.

Modifications were made in: Proposal and Appendix 2

8/ Appropriate modifications was added in the NTS file.

- **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 een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. Immers, de verschillende subdoelen zijn zowel tijdsafhankelijk als uitkomstafhankelijk van elkaar. Deze subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC 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 van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

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' (of 'aanleiding') om deze strijdigheid met andere 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 van dit project is het onderzoeken van het effect van 8 nieuw ontwikkelde virulentie remmers, alleen en in combinatie met een antibioticum op de ontwikkeling van longontsteking. De hypothese is dat de antivirulente stoffen bacteriegroei remmen en daarnaast een versturende

invloed kunnen hebben op het vormen van een bacteriële biofilm, waardoor antibiotica effectiever kunnen werken.

Het uiteindelijke doel is om te komen tot betere behandelingen voor longontsteking en in het verlengde daarvan ook betere behandelingsstrategieën voor patiënten die lijden aan ongeneeslijke chronische aandoeningen, zoals COPD en cystic fibrosis.

Er is geen directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel. Het uiteindelijke doel zal binnen de looptijd van het project niet gehaald worden. Het project is gericht op translationeel onderzoek m.b.t. het hierboven beschreven (directe) doel. Indien een van de geteste virulentieremmer/antibioticum combinaties effectief is in het hier gebruikte diermodel zal dat hoogstwaarschijnlijk tot een vervolgstudie leiden voor de verdere vertaling naar de mens. 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 project, wat gericht is op het onderzoek naar de werkzaamheid van virulentieremmers bij de behandeling van longontsteking 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 beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. De DEC wil wel vooropstellen 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 ervan 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 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 zulks het geval is.**
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*). **Het gekozen diermodel is door de aanvrager in Groningen ontwikkeld. Dit was geen gemakkelijk proces waarbij pas in de laatste fase het ongerief voor de dieren lager werd. De DEC heeft nadere vragen gesteld aan de aanvrager en overleg met de IvD gevoerd. O.b.v. de informatie verstrekt in de aanvraag en de antwoorden van aanvrager en IvD denkt de DEC dat het ongerief goed is ingeschat. Voorts vertrouwt de DEC 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 toediening van bacteriën, virulentie remmers, antibiotica, anesthesie en opoffering.**
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 criteria voor humane eindpunten in deze

aanvraag goed beschreven (zie ook vraag 11).

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 bacterie kolonisatie, de biodistributie van en interactie met virulentie remmers en antibiotica in de longen zijn 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 pilot experimenten, poweranalyse en 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 intensieve welzijnsmonitoring, 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 worden alleen vrouwelijke dieren gebruikt. De onderzoeker heeft naar de mening van de DEC deze keuze in de projectaanvraag voldoende onderbouwd. 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 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 "Assessing the effect of antivirulence drugs in promoting clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in lung infection mouse model", dat gericht is op het testen van virulentie remmers voor de behandeling van longontsteking het matige-ernstige ongerief, dat de 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 tot ernstig ongerief. Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: mogelijk groot voordeel voor patiënten.

Algemeen: Vergroting van medische kennis met betrekking tot de behandeling van longontsteking d.m.v. het doorbreken van antibiotica resistentie m.b.v. virulentieremmers.

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 "Assessing the effect of antivirulence drugs in promoting clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in lung infection mouse model" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na matig tot incidenteel ernstig 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 toedienen van *Pseudomonas aeruginosa* met longontsteking tot gevolg. Daarnaast zal medicatie (virulentieremmers en antibiotica) worden toegediend. De dieren worden opgeofferd aan het eind van de proeven.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter kunnen leiden tot een mogelijke nieuwe behandeling van longontsteking en relevante uitbreiding van medisch-wetenschappelijke kennis over het doorbreken van antibiotica resistentie bij longontsteking. Longontsteking is een ernstige aandoening die momenteel alleen behandeld kan worden met zware antibiotica kuren die vaak tot antibiotica resistentie en alle bijbehorende complicaties leiden. De behandeling is extra problematisch bij mensen die lijden aan COPD of cystic fibrosis. Dit project levert mogelijk nieuwe kandidaat medicijnen voor de behandeling van deze mensen. Dit is van maatschappelijk belang en kan kwaliteit van leven bij mensen bevorderen. Vandaar dat de DEC-RuG het hier beschreven onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk als vanuit maatschappelijk oogpunt, van zodanig belang acht dat de dierproeven gerechtvaardigd zijn.

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 proportioneel 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 "*Assessing the effect of antivirulence drugs in promoting clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in lung infection mouse model*", dat gericht is op het testen van nieuwe behandelmethoden voor longontsteking, de opoffering en het matige-ernstige ongerief, dat de dieren wordt aangedaan in het voorliggende project bevestigend.

Hoewel de DEC-RuG het belang van de intrinsieke waarde van het dier onderschrijft en oog heeft voor het te ondergaan ongerief van de proefdieren, weegt het 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 en er is geen sprake van duplicatie.

In de gekozen strategie wordt op bevredigende wijze tegemoetgekomen aan de vereisten van vervanging, vermindering en verfijning. Dit blijkt onder andere uit: 1) Het feit dat er goede go/no go en inclusiecriteria beschreven zijn. 2) Gedegen in vitro voorwerk dat het aantal te includeren dieren beperkt. 3) De fijnmazige welzijnsmonitoring m.b.v. lichaamstemperatuur sensors.

De DEC-RuG is ervan 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 "*Assessing the effect of antivirulence drugs in promoting clearance of Pseudomonas aeruginosa in lung infection mouse model*" als ethisch gerechtvaardigd en komt t.a.v. dit projectvoorstel tot een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de volgende voorwaarde op te nemen :

In de beginfase van de uitvoering moet er regelmatig terugkoppeling naar de IvD plaatsvinden aangaande ongerief en uitval.

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, specificieer 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*).

In eerste instantie wilde de aanvrager een aantal experimenten repliceren. Dit vond de DEC-RUG, zeker gezien de ongerief classificatie niet acceptabel, de aanvraag is gewijzigd op dit punt. Daarnaast waren er zorgen over het relatief hoge aantal dieren met ernstig ongerief. Overleg met de IvD en de beantwoording van vragen hierover door de aanvrager hebben deze zorg weggenomen.

De DEC is overigens niet gewoon projectaanvragen buiten de context c.q. haar verantwoordelijkheid en competentie te beoordelen.



Centrale Commissie Dierproeven

8.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1

9713 AV 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

AVD105002017854

Bijlagen

1

02 MRT 2017

Datum 1 maart 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 2 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Assessing the effect of antivirulence drugs in promoting clearance of Pseudomonas aeruginosa in lung infection mouse model" met aanvraagnummer AVD105002017854. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

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

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

U kunt met uw project "Assessing the effect of antivirulence drugs in promoting clearance of Pseudomonas aeruginosa in lung infection mouse model" starten. De vergunning wordt afgegeven van 2 maart 2017 tot en met 1 maart 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 2 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:

1 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD105002017854

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:

Datum:
1 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD105002017854

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: Rijksuniversiteit Groningen

Adres: A. Deusinglaan 1

Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 2 maart 2017 tot en met 1 maart 2022, voor het project "Assessing the effect of antivirulence drugs in promoting clearance of *Pseudomonas aeruginosa* in lung infection mouse model" met aanvraagnummer AVD105002017854, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD student. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

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

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|
| 3.4.4.1. Lung imaging for drugs distribution study | | | | |
| | Muizen (<i>Mus musculus</i>) / | 210 | 15% Ernstig 85% Matig | |
| 3.4.4.2. Lung infection model and treatment development. | | | | |
| | Muizen (<i>Mus musculus</i>) / | 3.010 | 15% Ernstig 85% Matig | |

Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk februari 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast

Aanvraagnummer:

AVD105002017854

wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

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

Voorschriften

Er moet regelmatig terugkoppeling naar de IvD plaatsvinden aangaande ongerief en uitval. In afstemming met de IvD wordt het ongerief zoveel mogelijk beperkt.



Aanvraagnummer:

AVD105002017854

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:

AVD105002017854

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.

| Inventaris Wob-verzoek W17-08 | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|----------------------------------|----------------|-----------------|--------|-------|--------|-------------------|--------|------|---|
| | | | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | |
| nr. | document NTS 2017855 | 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 | x | | |
| 4 | Bijlage | | | | x | x | x | x | | |
| 5 | DEC advies | | | | x | | x | x | | |
| 6 | Mail verzoek verduidelijking DEC | | | | x | | x | x | | |
| 7 | DEC advies nieuw | | | | x | | x | x | | |
| 8 | Advies CCD | | x | | | | | | | x |
| 9 | 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 | 10500 |
| | | <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 | 10500 |
| | | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | Rijksuniversiteit Groningen |
| | | KvK-nummer | 1179037 |
| 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 | A. Deusinglaan 1, [REDACTED] |
| | | Postbus | |
| | | Postcode en plaats | 9713 AV GRONINGEN |
| | | IBAN | NL45ABNA0474567206 |
| | | Tenaamstelling van het rekeningnummer | Rijksuniversiteit Groningen |
| 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 | <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?
- 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 - 5 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 5 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Transplantatie model voor verschillende subtypen leukemie om behandelmethodes te kunnen verbeteren
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|------------------------------|
| Naam DEC | DEC-RUG |
| Postadres | A. Deusinglaan 1, [REDACTED] |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
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 | Groningen |
| Datum | - - |
| 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.

Leukemie is een vorm van bloedkanker die helaas nog moeilijk te genezen is (CRUK 2014, Burnett et al 2011). De ziekte wordt veroorzaakt door mutaties in ons DNA, hetgeen leidt tot een tekort aan uitgerijpte bloedcellen en een ophoping van immature voorlopercellen in het beenmerg. Verschillende combinaties van DNA mutaties kunnen leiden tot leukemie, en leukemie is dan ook een verzamelnaam van een groot aantal verschillende soorten van bloedkanker. Leukemie wordt behandeld met chemotherapie, soms in combinatie met beenmergtransplantaties, en hoewel de behandeling in eerste instantie vaak goed lijkt aan te slaan komt de ziekte vaak na verloop van tijd terug. Dit komt doordat er in veel gevallen een aantal therapie-resistente cellen zijn achtergebleven na behandeling, ook wel leukemische stamcellen genaamd, met als gevolg dat de ziekte terugkeert. Om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen is het dus van groot belang om fundamenteel onderzoek te doen naar de moleculaire mechanismen aan de ontwikkeling van leukemie, naar leukemische stamcellen, en naar mechanismen die zorgen voor drug resistentie in leukemische stamcellen. Daarnaast is het van belang om in vivo muizenmodellen te hebben voor verschillende soorten van leukemie om zo nieuwe vormen van therapie te kunnen evalueren.

Ons lab onderzoekt verschillende eigenschappen van leukemische stamcellen met inbegrip van de mechanismen die ten grondslag liggen aan hun zelfvernieuwing en mechanismen die betrokken zijn bij resistentie tegen de behandeling. Om dit te kunnen doen hebben we *in vitro* modellen gegenereerd van leukemie. Deze modellen werden ontwikkeld met behulp van retro/lentivirale transductie van humane CD34 + cellen uit navelstrengbloed of beenmerg met verschillende oncogenen en tumor suppressor genen. Voorbeelden hiervan zijn MLL/AF9, MLL/ENL, geactiveerd STAT5, BCR/ABL, TAK1, K-RAS, NPM, Flt3-ITD, TP53, SPI1, AML1, NUP98-HOXA9, AML-ETO, CITED2 en Polycomb repressie complex (PRC) leden, zoals BMI1. Voor deze in vitro experimenten maken we veelal gebruik van stromale cocultures, waarbij leukemische cellen in coculture gebracht worden met stromale cellen. Zowel normale als ook leukemische stamcellen bevinden zich in ons beenmerg, waar ze omgeven zijn door een groot scala aan andere celtypen, zoals mesenchymale stromale cellen, chondrocyten en adipocyten, tezamen ook wel de beenmerg niche genoemd. Interacties tussen stamcellen en deze niche zijn van groot belang om processen zoals zelfvernieuwing te reguleren, maar ook de gevoeligheid voor therapeutica wordt in sterke mate bepaald door de aanwezigheid van zo'n niche. Om deze niche zo goed mogelijk te kunnen nabootsen maken we gebruik van deze stromale cocultures.

Naast deze in vitro modellen hebben we in vivo modellen kunnen genereren met behulp van onze retro/lentivirale modellen als ook van primaire patiënten samples uit onze uitgebreide biobank. Voor deze in vivo experimenten maken we gebruik van onze humane niche xenograft muizenmodellen, waarin we een humane niche creëren in de muis. Humane mesenchymale stromale cellen worden gehecht op 3D scaffold materiaal samen met matrigel welke vervolgens subcutaan geïmplant wordt onder de huid op de rug van de muis. Deze mesenchymale stromale cellen zullen vervolgens bot gaan vormen, en differentiëren in verschillende stromale componenten om zo een humane niche te vormen, waarna leukemiecellen geïnjecteerd kunnen worden. We hebben kunnen laten zien dat dit in vivo model momenteel het beste model is dat momenteel beschikbaar is om leukemieontwikkeling te kunnen bestuderen ().

Studies die wij in de afgelopen jaren hebben gedaan maakten het mogelijk om kleine populaties van cellen te identificeren uit primair AML patiënten materiaal alsook vanuit retro/lentivirale leukemie modellen welke functionele eigenschappen van leukemische stamcellen hebben. Verder hebben wij de mechanismen bestudeerd waarmee een verscheidenheid van oncogenen transformatie van humane primaire CD34 + cellen uit navelstrengbloed induceren. Voor onze studie maken we gebruik van cellen die van de patiënt zelf afkomstig zijn en daarnaast van onze leukemische retro/lentivirale modellen. Hematopoïetische tumoren ontstaan in het beenmerg, vanuit de zogenaamde stamcel niche, en nieuwe behandelmethoden zullen dan ook getest moeten worden in diermodellen waarin deze niche zo natuurgetrouw mogelijk is nagebootst. Dit is ook de locatie waar de tumorcellen door de chemotherapie en immunotherapie bereikt moeten kunnen worden, én het is ook de locatie waar de resistentie voor de therapie zich ontwikkelt en waar uiteindelijk de relapse van de ziekte zijn oorsprong kent.

Om die reden hebben we een gehumaniseerd muizenmodel ontwikkeld, door primair tumormateriaal in een humane "beenmergachtige" omgeving in muizen te laten uitgroeien (). Als daarin vervolgens tumorcellen van de patiënten worden geïnjecteerd, kunnen ze uitgroeien tot verschillende typen beenmergtumoren zoals we intussen hebben kunnen vaststellen.

Refs:

CRUK, Key Stats on the incidence, survival, mortality of specific cancers as well as the main causes and a table of the latest statistics., (2014)

Burnett, A., Wetzler, M., and Lowenberg, B., Therapeutic advances in acute myeloid leukemia, (2-10-2011) J.Clin.Oncol. 29, 487-494

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?

Binnen dit onderzoek willen we modellen van verschillende typen leukemie genereren en gebruiken met als doel:

- 1: om meer inzicht te krijgen in de mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van leukemie en de ontwikkeling van resistentie tegen bestaande therapieën,
- 2: om betere behandelmethoden tegen leukemie te kunnen ontwikkelen.

We maken gebruik van onze retro/lentivirale transductiemodellen om zo een groot scala van specifieke oncogenen tot expressie te kunnen brengen in primaire humane cellen. Daarnaast maken we gebruik van primair leukemisch materiaal dat we direct van patiënten verkrijgen dat in onze biobank opgeslagen is. Zowel de cellen verkregen vanuit transductiemodellen alsook primaire patiënten cellen kunnen *in vitro* en *in vivo* bestudeerd worden. In deze studies willen wij bepalen of de kandidaat LSC (leukemische stam cel) populaties die we *in vitro* geïdentificeerd hebben de mogelijkheid hebben om leukemie *in vivo* te induceren. Verder willen wij ook de rol van specifieke "target genen" die wij in onze *in vitro* experimenten hebben geïdentificeerd met betrekking tot normale hematopoïese en leukemische transformatie valideren.

Op basis van deze gegevens willen wij proberen om een doelgerichte behandeling voor verschillende typen leukemie te ontwikkelen.

In de afgelopen jaren hebben we al veel tijd geïnvesteerd in het ontwikkelen van humane niche xenograft muizenmodellen, waarin we een humane niche creëren in de muis (). Deze *in vivo* xenograft modellen zijn momenteel de beste modellen die in het veld beschikbaar zijn om leukemieontwikkeling te kunnen bestuderen en nieuwe behandelmethoden te kunnen uittesten, hetgeen de haalbaarheid van deze projecten sterk ten goede komt.

3.3 Belang

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

Hoewel we in de afgelopen jaren een veel beter inzicht hebben gekregen in het ontstaan van leukemie, blijft de ziekte lastig te behandelen. Gemiddeld genomen is de 5-jaars survival van patiënten met leukemie nog steeds minder dan 30%. Dit komt doordat er een aantal cellen ongevoelig zijn voor cytostatica. Deze cellen worden ook wel leukemische stamcellen genoemd. Deze cellen kunnen na deling nieuwe stamcellen genereren ('zelfvernieuwing') en daarnaast kunnen ze leukemische dochtercellen genereren die snel delen maar verstoord zijn in hun uitrijping, waardoor er een ophoping plaatsvindt van niet goed uitgerijpte cellen in het beenmerg en de normale bloedfuncties niet goed vervuld kunnen worden. Terwijl de snel delende leukemische dochtercellen zeer gevoelig zijn voor chemotherapie zijn de langzaam delende leukemische stamcellen juist relatief ongevoelig. Aangezien deze cellen via hun zelfvernieuwingseigenschappen in staat zijn steeds weer een nieuwe tumor te vormen komt de ziekte naar verloop van tijd terug. Om werkelijk betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen zullen we dus meer inzicht moeten krijgen in de biologie van de leukemische stamcellen.

Een tweede aspect dat de behandeling van leukemie patiënten bemoeilijkt is dat er in individuele patiënten genetisch verschillende subkloons tegelijkertijd kunnen bestaan. Omdat deze kloons genetisch van elkaar verschillen, gekenmerkt door verschillende mutaties in het DNA, zullen deze subkloons misschien ook elk een specifieke behandeling of drug vereisen. Met behulp van deep sequencing hebben we deze klonale heterogeniteit in de afgelopen jaren in detail in kaart kunnen brengen. Daarnaast zijn we momenteel in staat om met behulp van flow cytometrie gecombineerd met onze kennis van specifieke plasma membraan marker expressie profielen op leukemische stamcel populaties om subkloons te identificeren en uiteindelijk ook te targeten.

Het wetenschappelijke en uiteindelijk ook klinische/maatschappelijke belang van onze studies is om meer inzicht te krijgen in welke behandelmethoden effectief zijn in het targetten van leukemische stamcelpopulaties, om zo een betere therapie te kunnen ontwikkelen voor patiënten met deze groep van bloedkankers.

Het uiteindelijke doel van onze studies is om tot betere behandelmethoden te komen voor leukemie patiënten. Omdat leukemie een heterogene groep van ziekten is, is het waarschijnlijk dat er niet 1 enkele specifieke therapie ontwikkeld zal kunnen worden, maar dat per leukemisch subtype bepaald zal moeten worden welke behandelmethode het meest effectief is. Vandaar dat we binnen onze studie een aantal verschillende muizenmodellen zullen gebruiken die model staan voor deze verschillende subtypen leukemie.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Leukemie blijft vooralsnog een moeilijk te behandelen ziekte waaraan nog altijd meer dan 50% van de patiënten binnen een periode van 2 tot 5 jaar na het ontdekken van de ziekte zal overlijden. De behandeling van patiënten hangt af van velerlei factoren; zo spelen de genetische afwijkingen een belangrijke rol, maar ook het stadium van ziekte waarin de patiënt zich bevindt, leeftijd en conditie van de patiënt enzovoorts. In het algemeen geldt, dat patiënten behandeld worden met chemotherapie, soms gecombineerd of gevolgd door een stamceltransplantatie (hetzij autoloog, hetzij allogeen) en daarna meestal opnieuw chemotherapie.

Momenteel komt de ziekte na behandeling nog vaak terug. Dat komt omdat er therapie-resistente leukemisch stamcellen achter zijn gebleven in de patiënt. Een belangrijk doel is dus om beter werkende alternatieve therapieën te ontwikkelen. Er zal een beter inzicht moeten komen in wat exact de kenmerken zijn van de resistentie (sub-)populaties tumorcellen die in de therapie resistente patiënten aanwezig zijn. Daarnaast is er een dringende behoefte aan meer selectief (patiënt-specifiek) werkende cytostatica terwijl ook nieuwe vormen van immunotherapie ontwikkeld en getest worden moeten op hun effectiviteit, zowel als monotherapie als in combinatie therapie. Door de complexiteit van het ziektebeeld en de beoogde behandeling is het essentieel om hiervoor geschikte diersmodellen te kunnen inzetten, welke representatief zijn voor de verschillende soorten leukemische subtypen.

Om onderzoeksresultaten zo goed mogelijk te kunnen vertalen naar een behandeling voor patiënten is het van belang om modellen te gebruiken die zo natuurgetrouw mogelijk de ziekte in de patiënt nabootsen. Om deze reden hebben we in de afgelopen jaren hebben al veel tijd geïnvesteerd in het ontwikkelen van humane niche xenograft muizenmodellen, waarin we een humane niche creëren in de muis (). Deze in vivo xenograft modellen zijn momenteel de beste modellen die in het veld beschikbaar zijn om leukemieontwikkeling te kunnen bestuderen en nieuwe behandelmethode te kunnen uittesten.

Hoewel we hebben kunnen laten zien dat voor veel leukemische subtypen een humane omgeving essentieel is voor leukemie ontwikkeling in vivo, is het voor sommige andere subtypen minder van belang, en om deze subtypen te bestuderen zal een standaard IV injectie in muizen zonder humane scaffold afdoende zijn.

Naast ons gehumaniseerde muismodel zijn er de laatste jaren ook een aantal verschillende xenograft muizenmodellen gegenereerd waarin humane groeifactoren tot expressie gebracht worden. Dit betreft bijvoorbeeld NSG-SGM3 waarin humaan SCF, IL3 en GM-CSF tot expressie komen (Wunderlich et al, Leukemia 2010), en MISTRG muizen waarin humaan M-CSF, IL3/GM-CSF, TPO, and SIRPa tot expressie komen (Rongvaux et al, Nature Biotechnology 2014). In een vergelijkende studie willen we graag deze muizen vergelijken met onze humane scaffold muizen, en uiteindelijk zouden we ook graag onze scaffolds willen testen in deze humane cytokine muizen omdat te bestuderen in hoeverre dat nog een verdere verbetering van het humane scaffold model geeft.

Onze onderzoeksstrategie zal er globaal als volgt uitzien:

- a) Primair patiënten materiaal en cellen gegenereerd vanuit onze lentivirale transductiemodellen zullen in vitro gekweekt worden.
- b) In deze in vitro kweken zal de rol van leukemie subtype-specifieke targets bestudeerd worden en de gevoeligheid voor specifieke drugs zal beoordeeld worden. Dit is een belangrijk GO/NO GO beslismoment. Wanneer er in vitro geen effecten gemeten worden zullen er geen in vivo experimenten gestart worden.
- c) In vivo modellen zullen worden gegenereerd vanuit patiënten materiaal en lentivirale transductiemodellen gebruik makend van gehumaniseerde modellen, en na leukemie ontwikkeling zullen levende cel suspensies opgeslagen worden in onze biobank om zo verdere in vitro en in vivo experimenten (na secundaire transplantatie) te kunnen doen.
- d) Leukemie subtype-specifieke targets bestudeerd worden en specifieke drugs geïdentificeerd in in vitro kweken zullen in vivo getest worden.

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

Het gehumaniseerde muismodel zal de basis vormen voor de meeste experimenten die in dit project worden voorgesteld. Het biedt de mogelijkheid om de genetische en fenotypische kenmerken van de tumorcellen, het bijbehorende groeigedrag en de evolutie van de tumorcelpopulatie(s), onder invloed van chemo-immunotherapie bij de verschillende hematologisch maligniteiten te onderzoeken, maar daarnaast ook de mogelijkheden om nieuwe vormen van chemotherapie en immunotherapie te ontwikkelen of de effectiviteit van nieuwe chemotherapeutica bij therapie resistentie te testen en onderzoeken naar het doorbreken hiervan uit te kunnen voeren. Omdat steeds duidelijker wordt dat de stromale omgeving in de hematopoietische niche in belangrijke mate bijdraagt aan het ontsnappen aan de therapie alsmede het ontstaan van therapie resistentie, is het ook van groot belang dat de stromale component in het onderzoek betrokken kan worden. Het "hu-scaffold" model biedt uitgelezen mogelijkheden om al het voorgenomen onderzoek m.b.t. de pathofysiologie van en de therapie-ontwikkeling voor de hematologische tumoren uit voeren.

Binnen dit onderzoek willen we modellen van verschillende typen leukemie genereren en gebruiken met een tweeledig doel:

1: meer inzicht verkrijgen in de mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van leukemie. Binnen dit deel willen we onderzoeken hoe (epi)genetische afwijkingen acute myeloïde leukemie (AML), chronische myeloïde leukemie (CML), acute lymfoïde leukemie (ALL) of het myelodysplastische syndroom (MDS) kunnen veroorzaken. We zijn hier met name geïnteresseerd in mechanismen die leiden tot maligne transformatie en mechanismen die leiden tot resistentie tegen chemotherapie.

2: om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen. Deze experimenten die erop zijn gericht om nieuwe chemo-therapeutica, nieuwe inhibitors, nieuwe monoklonale antilichamen en nieuwe cellulaire immuuntherapiën in het preklinisch ontwikkeltraject te testen op hun effectiviteit op primaire tumorcellen, om ze daarna zo snel mogelijk naar klinische toepassing te brengen. We zullen hier ook specifiek bestuderen of deze nieuwe methoden beter zijn in het targetten van leukemische stamcellen. Onder andere met behulp van onze inzichten in plasma membraan eiwitten die specifiek op leukemische stamcel populaties tot expressie komen kunnen we in onze diermodellen kijken of maligne cellen na klassieke behandeling met chemotherapie zijn achtergebleven (minimal residual disease, ofwel MRD) of deze populaties wel verdwenen zijn met alternatieve nieuwe methoden

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.

Deel A. Meer inzicht verkrijgen in de mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van leukemie. Binnen dit deel zullen de volgende experimenten gedaan worden:

1. het identificeren van subpopulatie cellen binnen individuele patiënten die in staat zijn leukemie te induceren in onze gehumaniseerde muizenmodellen. Op basis van eerder geïdentificeerde plasma membraan markers kunnen subpopulaties gesorteerd worden om vervolgens te injecteren in humane scaffolds. Op deze manier zal meer inzicht verkregen worden in de meest primitieve leukemische stamcel fracties. Daarnaast zullen deze studies ons in staat stellen om inzicht te verkrijgen in genetisch verschillende subclones die vaak naast elkaar kunnen bestaan in individuele patiënten.
2. Muizen met leukemie zullen behandeld worden met klassieke chemotherapeutica (bijvoorbeeld daunorubicine/doxorubicine) waarna de sneddelende dochtercellen zullen verdwijnen maar de ongevoelige resistente leukemische stamcellen zullen achterblijven. Deze zullen vervolgens in detail bestudeerd kunnen worden om zo meer inzicht te krijgen in moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan tumor resistentie.
3. De rol van de microenvironment zal in detail bestudeerd worden. Veranderingen in stromale cellen die veroorzaakt worden door aanwezigheid van tumor cellen zal in detail bestudeerd kunnen worden in ons humane scaffold model. Specifiek zal gekeken worden naar veranderingen in gen-expressie, -receptorexpressie, -cytokine secretie, inductie van tumorvorming, veranderingen in specifieke interacties tussen (normale) stromale cellen/endotheel cellen en de hematologische tumorcellen of tussen maligne stromale cellen met normale hematopoietische stamcellen (HSC). Naast gezonde MSCs kunnen genetisch gemodificeerde MSCs of MSCs van patiënten in ons scaffold model meegenomen worden. Uiteindelijk doel is om meer inzicht te verkrijgen in de interacties tussen tumorcellen en het stroma, hoe het stroma zelf hierdoor beïnvloed wordt, en hoe de normale hematopoiese hierdoor wordt verstoord. Op deze wijze hopen we tevens om nieuwe targets te vinden waarmee leukemie ontwikkeling tegengegaan zou kunnen worden.

Deel B: de ontwikkeling van betere behandelmethoden. Met behulp van het humane scaffold muizenmodel zullen de volgende behandelmethoden getest worden.

1. Het uittesten van nieuwe specifieke kinase remmers of epigenetische remmers die zich nog in het preklinische traject bevinden maar die in in vitro experimenten efficiënt leken in het targetten van leukemische stamcellen.
2. Het uittesten van antilichaam-gebaseerde immunotherapie, waarbij specifieke remmers in immunoliposomen verpakt worden met aan de buitenkant specifieke antilichamen gericht tegen markers die tot expressie komen op leukemische cellen om zo de immunoliposomen naar de juiste targetcellen te sturen.
3. Het uittesten van cellulaire immuuntherapie waarbij CAR-T cellen of andere immuuncompetente cellen gebruikt zullen worden, met of zonder immuunmodulatie.

Voordat in vivo experimenten gestart worden zullen eerst in vitro experimenten uitgevoerd worden zoals beschreven in sectie 3.4.1 'Onderzoeksstrategieën'. Deze in vitro experimenten zijn belangrijke mijlpalen voor vervolggexperimenten en GO/NO GO beslissingen zullen genomen worden op basis van in vitro experimenten. Wanneer in vitro geen effectiviteit gevonden wordt zullen geen in vivo experimenten gestart worden.

Voor alle bovenstaande therapieën geldt dat ze met of zonder standaard chemotherapie getest zullen worden. Binnen de studies onder deel B zal specifieke aandacht worden besteed aan de analyse van de verschillende genetische leukemische subkloons die naast elkaar kunnen bestaan in individuele patiënten. Met behulp van deep-sequencing en plasma membraan marker expressie mbv flow cytometrie zal gekeken worden of alle subkloons even efficiënt getarget worden door een bepaalde behandelingsstrategie, of dat er wellicht bepaalde subkloons achterblijven na behandeling.

Een aantal voorbeelden van specifieke vragen die we in het onderzoeksproject willen gaan onderzoeken, en die deels via dier experimenten bestudeerd gaan worden zijn:

- hoe heterogeen is de tumorcelpopulatie in de diagnose monsters, dus voorafgaande aan de therapie, m.a.w. hoeveel subgroepen (klonen) zijn er aanwezig en in welke verhouding en welke zijn transplanteerbaar in het muizenmodel?
- Is er verschil tussen de subgroepen die in de "hu-scaffold" setting uitgroeien in vergelijking met het IV model zonder scaffolds waarin humane cytokines tot expressie komen (NSG-SGM3, MISTRG)?
- Is er een verdere verbetering van het "hu-scaffold" model wanneer de scaffolds geïmplanteerd worden in muizen waarin humane cytokines tot expressie komen (NSG-SGM3, MISTRG)?
- hoe onderscheiden de verschillende klonen zich ten opzichte van elkaar, i.e., wat is hun genetische en fenotypische profiel?
- hoe verandert deze onder invloed van de toegediende chemotherapie (resultierend in de "klonale getijden"); m.a.w. in hoeverre waren de resistente klonen reeds aanwezig bij aanvang van de therapie (dus in het uitgangsmateriaal), in hoeverre zijn ze door de gegeven behandeling uitgeselecteerd?
- zijn er overeenkomsten tussen patiënten? m.a.w. komen bepaalde genetische veranderingen bij meerdere patiënten binnen een subgroep voor?
- zijn deze afwijkingen te koppelen met het resistentie profiel en de toegepaste therapie?
- kunnen we, uiteindelijk, op grond van reeds bij diagnose vastgestelde afwijkingen in de tumorcellen, al bij aanvang van de therapie een betere keuze maken m.b.t. het "optimale" medicijn voor de betreffende patiënt? Ook wel aangeduid met "personalized treatment"?
- bij het onderdeel antilichaam-gebaseerde immunotherapie zullen immunoliposomen worden getest met aan de buitenkant antilichamen tegen specifieke leukemische stamcel targets getest om zo drugs specifiek naar leukemische stamcellen te sturen. De effectiviteit van deze therapie zal vergeleken worden met cellulaire immuuntherapie waarin T cellen met d.m.v. biotechnologie geconstrueerde chimere antigen receptoren (CAR-T cellen) zullen worden gebruikt om leukemische stamcellen te targeten.

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Transplantatie model voor verschillende subtypen leukemie om behandelmethodes te kunnen verbeteren. |
| 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. 10500
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. Rijksuniversiteit Groningen
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Transplantatie model voor verschillende subtypen leukemie om behandelmethododes te kunnen verbeteren. |
- 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 dit moment is in het onderzoek naar leukemie het gebruik van muizen modellen een van de meest geavanceerde manieren om inzicht te verkrijgen in de verloop, kinetiek en behandelbaarheid van deze erg heterogene ziekte. Daarom wordt in ons lab ervoor gekozen om met behulp van immunodeficiënte muizen modellen (NOD-Scid of Rag gebaseerd) de ziekte verloop in de patiënt na te bootsen.

Het onderzoek zal bestaan uit drie onderdelen:

1. Het laten uitgroeien van primaire tumorcellen afkomstig uit bloed of beenmergmonsters van patiënten met verschillende vormen van hematologische maligniteiten (o.a. leukemie en myeloom) in een gehumaniseerde hematopoietische "niche" in muizen ("hu-scaffold").
2. Het zoeken naar doel genen (target genen) die een gespecialiseerde behandeling van de verschillende hematologische maligniteiten mogelijk maken en/of bevorderen met als doel het behandelen van de ziektebeelden in de muis en later de mens. Hierbij zijn ook veranderingen in de beenmergomgeving (hematopoietische niche) in de oorspronkelijke patiënten en de interactie van tumorcellen met deze al dan niet veranderde niche van groot belang.
3. Het uitvoeren van een drug screen met verschillende veelbelovende therapeutische middelen zoals "small molecules", monoclonale antilichamen, nieuwe vormen van cellulaire immunotherapie, klassieke chemotherapie en combinaties hiervan.

Voor deze studies maken we gebruik van humane scaffold ("hu-scaffold") muizen waarbij een gehumaniseerde hematopoietische "niche" wordt gecreëerd in immuun deficiënte muizen, een model dat we in de afgelopen jaren succesvol hebben opgezet in ons lab

[REDACTED]). 4 keramische scaffolds (dragermateriaal bestaande uit tri-calciumfosfaat) worden gecoat met humane mesenchymale stromale cellen (MSCs) subcutaan met een mix van matrigel op de flanken van de muis geïmplant. Deze stamcellen ontwikkelen tot bot en bijbehorend stromaal weefsel in en om de "scaffolds" na implantatie in de muis. Deze "hu-scaffold modellen" zijn uniek vanwege het feit dat wanneer primair materiaal van hematologische tumoren (d.w.z. direct van patiënten afkomstig) hierin geïnjecteerd wordt, dat de gecreëerde humane omgeving de uitgroei van deze primaire tumorcellen ondersteunt. Dit is een groot voordeel ten opzichte van het IV model, omdat ook cellen die in de IV setting niet uitgroeien in het "hu-scaffold" model succesvol zijn ([REDACTED]).

Naast ons gehumaniseerde muismodel zijn er de laatste jaren ook een aantal verschillende xenograft muizenmodellen gegenereerd waarin humane groeifactoren tot expressie gebracht worden. Dit betreft bijvoorbeeld NSG-SGM3 waarin humaan SCF, IL3 en GM-CSF tot expressie komen (Wunderlich et al, Leukemia 2010), en MISTRG muizen waarin humaan M-CSF, IL3/GM-CSF, TPO, and SIRPa tot expressie komen (Rongvaux et al, Nature Biotechnology 2014). In een vergelijkende studie willen we graag deze muizen vergelijken met onze humane scaffold muizen, en uiteindelijk zouden we ook graag onze scaffolds willen testen in deze humane cytokine muizen omdat te bestuderen in hoeverre dat nog een verdere verbetering van het humane scaffold model geeft.

Hoewel we hebben kunnen laten zien dat voor veel leukemische subtypen een humane omgeving essentieel is voor leukemie ontwikkeling *in vivo*, is het voor sommige andere subtypen minder van belang, en om deze subtypen te bestuderen zal een standaard IV injectie in muizen zonder humane scaffold afdoende zijn.

Primaire uitkomstparameters

1. Na het injecteren van de tumorcellen in de hu-scaffolds is de belangrijkste parameter: "tumor groei ja of nee", naast de vraag of er ook circulerende tumorcellen in het bloed of andere organen aanwezig zijn. Het bloed wordt hierop eens in de 3 weken d.m.v. submandibulaire punctie gecontroleerd.
2. Vervolgens worden de groeiende tumoren gemeten m.b.v. een schuifmaat: niet alleen om groeisnelheid te bepalen, maar mede om op basis van tumorvolume het moment van bereiken van het humane eindpunt te kunnen bepalen en het experiment te kunnen stoppen. Dit geldt ook voor het percentage van leukemische cellen in het perifere bloed, die regelmatig (elke 3 weken) wordt gemeten om een goed tijdstip voor het humane eindpunt te kunnen bepalen.
3. Tijdens het volgen van de tumor groei zullen de muizen, kort na de detectie van de tumor en vlak voor terminatie, ook een MRI scan ondergaan om ook visueel een begin een eindpunt op te nemen en eventuele atypische uitgroei naar de borst-/ buikholte tijdig te detecteren. In het geval van een behandeling kan nog voor een derde scan voor de start van de toediening van therapie worden gekozen om een eventuele afname van het tumor volume nauwkeurig in correlatie met de laatste "terminale" scan te kunnen berekenen.
4. Tenslotte zal, gebruikmakend van de geogoste tumor cellen, een uitgebreide analyse van de tumoren en de muize-compartimenten (bloed, beenmerg, milt en lever) uitgevoerd worden, zowel genetisch (DNA/RNA analyse), met FACS, immunohistochemische analyse van de tumor *in situ* en *in vitro* assays. Levende cellen zullen worden opgeslagen in onze biobank voor seriële transplantaties of andere vervolgstudies.

Al deze analyses zijn reeds door ons beproefde methoden die routinematig worden uitgevoerd.

Voordat gestart wordt met behandelingsexperimenten *in vivo* experimenten zal eerst worden vastgesteld of een bepaalde behandeling effectief is *in vitro* zoals in de project aanvraag in detail beschreven. Op basis van deze *in vitro* gegevens kan dan een behandelplan worden opgesteld voor een specifieke behandeling van de verschillende hematopoïetische maligniteiten waarvan wij in onze "muizen kliniek" model dieren genereren door middel van moderne therapieën zoals hierboven genoemd.

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 muizen die alleen een IV injectie ondergaan zullen 24 uur voor de injecties een bestraling van maximaal 2Gy ondergaan om de "homing" van de cellen te bevorderen. Verder zullen de dieren de volgende dag een IV injectie ontvangen. Vanaf een periode van 4 tot 6 weken na injectie zullen de bloedafnames beginnen. Bloedafnames worden altijd via de wangprik zonder verdoving (submandibulaire punctuur) gedaan met een

interval van 3-4 weken afhankelijk van de kinetiek van het patiënten of model sample. Als er een percentage van 50% humane cellen in het bloed wordt benadert dan worden de dieren humaan via cervicale dislocatie onder isofluraan anesthesie getermineerd.

De muizen die worden voorzien van solide "hu-scaffolds" worden onder isofluraan anesthesie geopereerd. De preoperatieve pijnstilling is buprenorfine 0,1 mg/kg lichaamsgewicht en de scaffolds (4 per dier) worden in subcutane pockets aan beide flanken van de muis geïmplant. Dit wordt gedaan door een incisie per 2 subcutane pockets in het midden van de rug te plaatsen en de pockets vanuit deze positie aan de linker en rechter kant van de incisie te plaatsen. De bovenste twee implantaten zullen dan ter hoogte van het hart zitten en de onderste twee ter hoogte van de nieren. Scaffolds worden geïmplant samen met matrigel welke binnen enkele minuten zal uitharden tot een rubberachtige substantie, dit is het uiteindelijke implantaat.

Wondjes worden gelijmd met weefsel lijm en de dieren worden tijdelijk solitair gehouden om het genezen te versnellen. Deze muizen zullen 6-8 weken na implantatie de (maligne) hematopoietische cellen via een in de "hu-scaffold" geplaatste subcutane injectie ontvangen.

Vanaf een periode van 4 tot 6 weken na injectie zullen de bloedafnames beginnen. Bloedafnames worden altijd via de wangprik zonder verdoving (submandibulaire punctuur) gedaan met een interval van 3-4 weken afhankelijk van de kinetiek van het patiënten of model sample. Bij deze 3-4 wekelijkse bloedafnames (submandibulaire punctuur) wordt <10% TBV (totaal bloed volume) van de muis afgenomen. Uitgaande van een totaal bloedvolume van 1,46ml bij een muis van 25 gram ($58,5 \text{ ml/kg} \times 0,025 \text{ kg} = 1,46 \text{ ml}$) wordt er dan ook voor gezorgd dat er per bloed afname niet meer dan 100ul (6,85%) af wordt genomen. Hierdoor zal de muis weinig hinder ondervinden van het bloedverlies en de afgenomen hoeveelheid snel weer aan kunnen maken. Als er een percentage van 50% humane cellen in het bloed of een totaal tumor volume op de "hu-scaffolds" van 2cm^3 wordt benadert dan worden de dieren humaan via cervicale dislocatie onder isofluraan anesthesie getermineerd. Tumor volume wordt minimaal wekelijks bepaald door regelmatige uitwendige meting met een schuifmaat onder het gebruik van de aangepaste elliptische formule ($L \cdot B^2 \cdot 0,5$). Tijdens het hele experiment worden de dieren regelmatig (1xweek) gewogen.

Om het volgen van de tumor groei te verbeteren en meer inzicht in de groeikinetic te verkrijgen zullen de "hu-scaffold" dieren ook maximaal 3 MRI scans (MR imaging) ondergaan. De eerste scan wordt kort na de detectie van de beginnende tumor gedaan en de tweede kort voor de terminatie van het dier. Een eventuele derde scan zou net voor het begin van een eventuele therapie worden gedaan om een mogelijke vermindering van het tumor volume tot de laatste scan voor de terminatie van het dier nauwkeurig te kunnen documenteren. Ook willen wij graag de mogelijkheden van bioluminescentie (in het verleden toegepast) en "near IR optical imaging" in deze setting verder bestuderen en optimaliseren, gezien beide technieken niet invasief en weinig belastend voor de muizen zijn en ons naast de MRI een gedetailleerd overzicht van de situatie in de muis tijdens de tumor ontwikkeling kunnen geven.

Deze experimentele aanpak heeft in het verleden al goede en betrouwbare resultaten met zo min mogelijk ongerief voor de dieren opgeleverd.

Inhibitors en drugs zullen via intraperitoneale, intaveneuze of intrascaffold routes toegediend worden, of waar mogelijk via het drinkwater of voedsel. Per toediening zal niet meer dan de maximaal toegestane volume toegediend worden waarbij gelet zal worden op het vehicle. De frequentie van toediening zal bepaald worden door de drug die wordt gebruikt om zo klinisch relevant mogelijk te werken. Toediening van drugs vindt gewoonlijk plaats over een periode van 1-4 weken.

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

Een belangrijke overweging bij het inschatten van het aantal dieren dat voor dit onderdeel van het project nodig is, is het gegeven dat van elk van de hoofdtypen hematologische maligniteiten (te weten Acute Myeloïde Leukemie (AML), Acute lymfatische Leukemie (ALL), Chronische Myeloïde Leukemie (CL), Lymfoom (L) en Myelodysplastisch syndroom (MDS)) verscheidene subgroepen onderscheiden kunnen worden.

Om een goed overzicht te krijgen van de karakteristieken van elk van de patiëntengroepen en om een goede representatie van elk van de subtypen in de biobank te krijgen, moeten er per subtype een groot aantal patiënten worden onderzocht. Ook binnen AML, ALL, CML, L en MDS kunnen weer subgroepen worden onderscheiden op basis van specifieke genetische afwijkingen. Ons streven is om in totaal zo'n 75

verschillende patiënten groepen in de muizenkliniek gerepresenteerd te hebben (40 AML, 10 ALL, 5 CML, 10 L, 10 MDS). Elke tumor zal anders zijn en de variatie is van tevoren niet bekend, daarom zullen per subgroep meerdere samples geïncludeerd worden.

Na engraftment in muizen zullen levende cellen kunnen worden bewaard in onze biobank voor verder karakterisatie en secundaire transplantatie om zo specifieke therapieën te kunnen uittesten.

Op basis van onze voorgaande studies weten we dat de kans dat de tumorcellen van patiënten in het hu-scaffold model uitgroeien voor AML en CML heel groot is (>95%), voor MDS >50% en voor L hebben we nog niet voldoende ervaring.

De groei van tumoren en de effecten van drugs hierop zal in twee onafhankelijke pilot experimenten geanalyseerd worden. Als significantie bereikt is zullen geen verder proeven meer gedaan worden, maar als er verschil is tussen de twee experimenten wordt er mogelijk nog een experiment gedaan.

B. De dieren

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

Voor onze proeven gebruiken wij uitsluitend immuun-deficiënte, vrouwelijke muizen.

Tot nu toe hebben wij de NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ stam (NSG) met succes gebruikt en zouden dit ook graag verder doen. Echter staan wij natuurlijk ook stil bij de continue ontwikkeling van nieuwe immuundeficiënte muizen modellen zoals bij voorbeeld de MISTRG stam (C;129S4-Rag2^{tm1.1Flv} Csf1^{tm1(CSF1)Flv} Csf2/Il3^{tm1.1(CSF2,IL3)Flv} Thpo^{tm1.1(TPO)Flv} Il2rg^{tm1.1Flv} Tg(SIRPA)1Flv/J; <https://www.jax.org/strain/017712>) of de NSG™-SGM3 stam (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl Tg(CMV-IL3,CSF2,KITLG)1Eav/MloySzJ; <https://www.jax.org/strain/013062>).

Wij willen graag de mogelijkheid behouden om in het geval van een nieuwe en geoptimaliseerde stam een pilot experiment met een aantal bewezen patiënten samples te doen om te evalueren of deze dieren geschikt zijn voor ons onderzoek en betrouwbare en indien mogelijk zelfs verbeterde resultaten ten opzichte van de NSG muis opleveren.

Deze optie lijkt ons vooral belangrijk omdat het project voor 5 jaar is gepland en in deze tijd veel nieuwe ontwikkelingen kunnen ontstaan. Hierdoor zou het overstappen op een andere muizen stam potentieel nodig kunnen zijn om de allerbeste resultaten te bereiken.

Het gebruik van vrouwtjes is erop gebaseerd dat deze een betere "engraftment" van hematopoïetische maligne cellen vertonen (McDermott *et al*, 2010) en op de betere verdraagzaamheid van vrouwtjes in groepshuisvesting.

Gebaseerd op het gebruik van dieren in het verleden en de beschikbaarheid van patiënten materiaal zouden wij graag de volgende aantallen aan willen vragen:

Onderdeel bio-banking:

Met gemiddeld 75 te onderzoeken leukemie subgroepen, met 5 muizen per monster komt het aantal muizen voor de duur van het project op 375. Uit onze ervaring van de afgelopen jaren blijkt dat 5 dieren per groep nodig is om reproduceerbare resultaten te genereren (rekening houdend met variatie tussen individuele muizen, foutenmarge bij het injecteren van cellen). Dit is van belang om alle leukemie subtypen voldoende gerepresenteerd te hebben.

Onderdeel target genen:

Gebaseerd op ons gebruik in het verleden gaan wij ervan uit dat wij in elk geval 30 nieuwe diersmodellen met onze target genen zullen ontwikkelen in de volgende 5 jaar. Per nieuw model gaan wij van 5 dieren uit. Omdat het nog niet zeker is dat wij ook het fenotype van de nagebootste hematologische maligniteit kunnen bereiken in de muis zullen deze experimenten dan ook als pilot experimenten worden beschouwd. Uit onze ervaring van de afgelopen jaren blijkt dat 5 dieren per groep nodig is om reproduceerbare resultaten te genereren (rekening houdend met variatie tussen individuele muizen, foutenmarge bij het injecteren van cellen). Met deze berekening komen wij dan op 150 dieren in 5 jaar voor deze experimenten.

Onderdeel drugscreen:

Voor de drugscreening zullen wij de succesvolle patiënten samples uit de biobank als secundair model gebruiken. Per groep zullen 5 muizen, met elk 4 scaffolds, geïncludeerd worden, dus 5 in de controle arm en 5 in de behandelingsarm. Waar mogelijk zullen verschillende behandelingen in 1 experimenten geïncludeerd worden zodat er maar 1 controle groep van 5 muizen nodig is. Voor een representatief experiment inclusief controles en verschillende concentraties inhibitors zullen 30 muizen nodig zijn.

In plaats van Immunoliposomen zullen ook CAR-T cellen getest worden, of in plaats van small molecule

inhibitors zullen ook conventionele therapieën (chemotherapeutica) getest worden. Binnen een periode van 5 jaar schatten we dat we in totaal 3 verschillende drugscreen experimenten zoals hierboven beschreven zullen uitvoeren, in duplo, op een totaal van 10 verschillende leukemie modellen. In totaal zullen hiervoor dus nodig zijn: 3 (drugscreen modellen) x 2 (duplo) x 30 muizen (per screen) x 10 leukemie modellen = 1800 dieren in 5 jaar.

De groei van tumoren en de effecten van drugs hierop zal dus in twee onafhankelijke pilot experimenten geanalyseerd worden. Als significantie bereikt is zullen geen verder proeven meer gedaan worden, maar als er verschil is tussen de twee experimenten wordt er mogelijk nog een experiment gedaan.

Mogelijke pilot experimenten met nieuwe stammen:

Per jaar zouden wij graag de mogelijkheid willen hebben om 30 muizen ♀ (6-8 weken oud bij begin experiment) van een nieuwe stam (zoals MISTRG of NSG-SGM3) in pilot experimenten te gebruiken. Per 5 jaar zou dat dan op 150 muizen ♀ uitkomen.

In **totaal** zouden wij dus graag **2475 muizen ♀** voor **5 jaar** aan willen vragen.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Al onze dierexperimenten worden vooraf gegaan door uitgebreide *in vitro* experimenten en continue terugkoppeling met behaalde resultaten vanuit onze eigen groep, maar ook vanuit recente publicaties uit het onderzoeksveld. Hierdoor worden geen dieren voor overbodige herhalingen gebruikt en de samples met de grootste belofte tot succes uitgekozen om een optimale verloop van de proeven te faciliteren en verspilling van dieren te voorkomen. Door de implantatie van meerdere "hu-scaffolds" (4 per muis) kan elke tumor die op het dier ontwikkeld afzonderlijk worden geanalyseerd wat het aantal dieren fors omlaag brengt. Statistische relevantie kan sneller worden bereikt door een maximum aantal van 4 uitgegroeide hematologische maligniteiten/tumoren per muis.

Vervanging: Gezien het feit dat het helaas niet mogelijk is om de complete systemische ontwikkeling van leukemie en andere hematopoietische maligniteiten in een *in vitro* setting na te bootsen blijven dier experimenten nodig. Dit vooral omdat het samenspel van de humane niche inclusief het vormen van bot, rekruteren van bloedvaten en ontwikkeling van een 3D omgeving ervoor zorgt dat het geobserveerde fenotype dicht bij het ziekteverloop van de mens ligt technisch niet haalbaar is in een alleen op *in vitro* data gebaseerd experiment.

Vermindering: Door de mogelijkheid om maximaal 4 op zichzelf staande hematologische maligniteiten/tumoren te creëren per muis, wanneer voor het "hu-scaffold" model met humane niches wordt gekozen, kan het aantal dieren dat per patiënten sample wordt benodigd enorm omlaag worden gebracht zonder statistische significantie te verliezen. Waar vroeger 4 muizen nodig waren om 4 hematologische maligniteiten/tumoren te creëren kan dit nu met behulp van een muis worden gedaan.

Verfijning: Door het gebruik van de humane niche blijven de hematologische maligniteiten/tumoren gelokaliseerd en worden alleen heel zelden systemisch. Hierdoor hebben de dieren weinig last van het

ziekteverloop en is de tumor groei de enige factor die voor enig ongerief kan zorgen. Alleen de dieren die ter controle van de procedure een IV injectie ontvangen hebben een kleine kans op systemische ziekte. Hierbij wordt op basis van regelmatige bloedafnames de hoeveelheid kanker cellen in het bloed (<50% als maximum) strikt gecontroleerd voor een tijdige interventie.

Verder verfijning vindt plaats door gebruik te maken van een zg 'pamperprotocol'. Na bestraling en/of operatie (implantatie) ontvangen de dieren 2 weken lang elke dag een aanvullend dieet naast hun *ad libitum* beschikbare standaard brok en drinkwater. Dit dieet is een met water aangemaakt papje (RM Convalescence+ BG SY (M) + standaard brok in poedervorm 1:1) en heeft een hoog energiegehalte om het herstel te bespoedigen en gewichtsverlies te voorkomen. Door de zachte consistentie en de formulering is het makkelijk te eten en te verteren. Verder ontvangen de dieren twee weken na bestraling ook nog drinkwater met antibioticum (Neomycine, 3.5 gr/l) omdat de dieren in deze periode extra kwetsbaar zijn.

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.

Humane eindpunten: De dieren worden nauwlettend in de gaten gehouden en naast de regelmatige bloedafnames om de hoeveelheid leukemiecellen in het bloed te bepalen worden ook gewicht, gedrag en eventueel tumor volume gecontroleerd. De tumoren worden 1-2 keer wekelijks met behulp van een schuifmaat uitwendig opgemeten om te voorkomen dat de massa de toelaatbare grens overschrijdt. Ook de MRI scan aan het begin en einde van de tumorontwikkeling draagt bij aan nauwgezette monitoring van de situatie in de muis. De dieren worden altijd ruim op tijd humaan getermineerd. Dit gebeurt door middel van cervicale dislocatie onder isofluraan anesthesie. Voor verdere uitleg van specifieke parameters zie specificatie paragraaf J.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Deze dierproeven zijn niet eerder uitgevoerd. De patiënten samples die wij in de experimenten testen zijn uniek en worden niet ook elders getest. Het gehumaniseerde scaffold model zelf is uniek en er is nogal wat specifieke ervaring voor nodig om dit met succes toe te passen. Die is in onze groep aanwezig, aangezien we specifiek hiervoor zijn getraind door de groep die dit model heeft ontwikkeld en de procedure al jaren met succes uitvoeren en optimaliseren. We zijn in regelmatig contact met deze groep om herhaling te voorkomen en het onderzoek te stroomlijnen.

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.

Voorafgaande aan de subcutane implantaties van de "scaffolds" ontvangen de dieren eenmalig een subcutane injectie van buprenorfine 0,1 mg/kg lichaamsgewicht. Het zelfde geldt voor een mogelijke *intra femorale* beenmerg aspiratie.

Operaties, injecties voor het verkrijgen van "hu-scaffolds" volgens methode 2, beenmerg aspiraties, MRI scans en terminatie worden altijd onder Isofluraan anesthesie uitgevoerd in overeenkomst met onze humane eindpunten.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Tumor kan groeien en ongerief veroorzaken

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Tumorgroei

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

Bij een teveel aan ongerief zal de muis getermineerd worden.

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Verwachte eindpunten: Wanneer de muizen een percentage van 50% humane leukemische cellen in het bloed of een totaal tumor volume van maximaal 2cm³ (conform Code Of Practise) naderen worden deze humaan getermineerd door middel van cervicale dislocatie onder isofluraan anesthesie.

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

Ervaringen uit het verleden laten zien dat een uitval percentage van onder de 5% een reële schatting zou zijn.

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.

Op basis van de strenge bewaking van het welzijn van de dieren zal het ongerief matig zijn. Dit is dan gebaseerd op de operaties/en of bestraling van de dieren als hoogste 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.

Het termineren van de muizen aan het einde of als onderdeel van de proef is nodig omdat de organen, het beenmerg en het bloed van de muizen op het lab opgewerkt en geanalyseerd moet worden. Dit is ook erg belangrijk voor het onderdeel "biobanking".

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: Interne RUG code **8079**
2. Titel van het project: **Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten**
3. Titel van de NTS: **Transplantatie model voor verschillende subtypen leukemie om behandelmethododes te kunnen verbeteren**
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: **24-01-2017**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **20-01-2017 tot 24-01-2017**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **24-01-2017**
 - advies aan CCD: **02-02-2017, aangepast 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: **20-01-2017**

Gestelde vraag/vragen:

- 1/ Gelieve in de bijlage de limiet aan de totale bloedafname middels de 3-4 wekelijkse bloedafnames (submandibulaire punctuur) te kwantificeren.
- 2/Het gebruik van 5 dieren per groep zou nader onderbouwd moeten worden.
- 3/U stelt onder B. De dieren: 'Als significantie bereikt is zullen geen verder proeven meer gedaan worden. De DEC vraagt zich af dit een juiste benadering is. Zou het niet beter zijn om de vraagstelling met een vooraf bepaalde power te benaderen?
- 4/De experimenten zullen bij vrouwtjes uitgevoerd worden. Zijn er verschillen te verwachten tussen mannen en vrouwen? Zullen de bevindingen uit de experimenten algemeen geldend zijn bij gebruik van enkel vrouwtjes c.q. zijn ze te generaliseren?

- Datum antwoord: **24-01-2017**

- Verstrek(e) antwoord(en):

- 1/ Dit is nu toegevoegd in de bijlage, pagina 3
- 2/ Dit is gebaseerd op onze ervaring in het verleden. We hebben de volgende zin toegevoegd, pagina 4 onderdeel biobanking, onderdeel target genen:
 - Uit onze ervaring van de afgelopen jaren blijkt dat 5 dieren per groep nodig is om reproduceerbare resultaten te genereren (rekening houdend met variatie tussen individuele muizen, foutenmarge bij het injecteren van cellen).
- 3/ Aangezien het pilotexperimenten betreft is het lastig om vooraf een poweranalyse te doen. Dit staat ook zo vermeld op pagina 5. Zo hebben we onze experimenten in het verleden ook altijd gedaan, en zien niet goed in hoe we dat nu anders zouden kunnen formuleren.
- 4/ Zoals al in de aanvraag vermeldt is het gebruik van vrouwtjes erop gebaseerd dat deze een betere "engraftment" van hematopoietische (maligne) cellen vertonen (Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains; McDermott et al, 2010) en op de betere verdraagzaamheid van vrouwtjes in groepshuisvesting.
- In boven genoemde paper is ook de "engraftment" van de mannetjes beschreven. Tussen de geslachten werd vastgesteld dat vrouwtjes 1,4 keer betere "engraftment" vertonden als er meer dan 5000 cellen werden geïnjecteerd. Bij een lagere hoeveelheid cellen kon dat verschil oplopen tot 11 keer betere "engraftment" bij NSG vrouwtjes ten opzichte van NSG mannetjes, ondanks dat de NSG mannetjes ook duidelijke "engraftment" vertonden.
- Uitgaande van deze informatie is alleen voor het diermodel het vrouwtje een handigere keuze, door snellere en duidelijker resultaten en kunnen de gegevens ook vertaald worden naar de mannelijke muis. Uiteindelijk zijn de resultaten dus zeker te generaliseren.
- **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 een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC 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 van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

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 1/ meer inzicht te krijgen in de mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van leukemie en de ontwikkeling van resistentie tegen bestaande therapieën, en 2/om betere behandelmethoden tegen leukemie te kunnen ontwikkelen. Bovenstaande met gebruikmaking van het *in vivo* xenograft muismodel. Het uiteindelijke doel is om tot betere behandelmethoden te komen voor leukemie patiënten.

Er is deels een directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel want uit patiënten geïsoleerde leukemie cellen zullen worden getest in het muizenmodel. Het uiteindelijke doel zal waarschijnlijk binnen de looptijd van het project niet gehaald worden. Het project is gericht op fundamenteel

en translationeel onderzoek m.b.t. de hierboven beschreven (directe) doel. 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 fundamentele/translationele project, wat gericht is op onderzoek naar mechanismen bij het ontstaan van leukemie, ontwikkeling van resistentie tegen bestaande therapieën, en mogelijke betere behandelmethoden tegen leukemie in een *in vivo* xenograft model, 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 en levensverwachting van patiënten kan hierdoor verbeterd worden. Ook 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 beschreven 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 vooropstellen 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 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 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 zulks het geval is.**

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 bestraling, injectie van inhibitor (drugs) en maligne hematopoietische cellen, bloedafnames, scaffold implantatie en opoffering.**

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 leukemie ontwikkeling en behandeling (c.q. ontwikkeling van resistentie) zijn alleen na te bootsen in een gehumaniseerd muizenmodel.**

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 worden vrouwelijke dieren gebruikt. De onderzoeker heeft naar de mening van de DEC deze keuze in de projectaanvraag voldoende onderbouwd. 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 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.

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project "Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten", dat gericht is op de verbetering van de behandelmethoden van leukemie bij mensen en daarmee de vergroting van de kans op genezing bij dergelijke patiënten het matige ongerief, dat ongeveer 80% van de muizen wordt aangedaan dan wel licht ongerief bij de overige dieren in het onderhavige project?

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **matig nadeel.**

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **potentieel groot voordeel.**

Algemeen: **vergroting van medische kennis met betrekking tot het ontstaan van leukemie en de behandeling daarvan, leidend tot een 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 "Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na licht dan wel 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 toedienen van maligne cellen al dan niet in combinatie met een scaffold, monitoring middels MRI en herhaalde bloedafname, het toepassen van conventionele en experimentele behandelingen en de opoffering aan het eind van de proeven. Dit zal ook repercussies hebben op hun natuurlijke gedrag.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot een relevante uitbreiding van medisch-wetenschappelijke kennis over het ontstaan van leukemie. Voor de betreffende patiënten is verbetering van hun welzijn en mogelijk uitzicht op genezing van leukemie van groot belang. Dit verhoogt hun levensverwachting en geeft een betere kwaliteit van leven.

Vandaar dat de DEC-RuG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk, translationeel 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.

De DEC-RuG beantwoordt de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project "Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere

behandelmethode te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten”, dat gericht is op de verbetering van de behandeling van leukemie, de opoffering en het lichte dan wel 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. 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 “Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten” als ethisch gerechtvaardigd en voorziet de DEC-RuG 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, specificieer 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.

Van: [REDACTED]
Verzonden: donderdag 16 februari 2017 16:25
Aan: Info-zbo
Onderwerp: RE: Aanvraag AVD105002017855: aanvullend advies
Bijlagen: DEC advies 8079 [REDACTED]160217.pdf

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED]

Het betreft hier (inderdaad) een fout. Hierbij stuur ik een aangepast advies met daarin de correcte formuleringen

Het advies is versleuteld met Filesecure

Vriendelijke groeten,

[REDACTED]
Secretaris DEC-RUG

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]
Sent: woensdag 15 februari 2017 17:49
To: [REDACTED]
Subject: Aanvraag AVD105002017855: aanvullend advies

Geachte DEC,

Wij hebben een aanvraag in behandeling waarover u advies heeft gegeven, te weten AVD105002017855.

Wij hebben een vraag naar aanleiding van uw advies:

-Uw antwoorden bij vragen C2 en C6 zijn niet geheel duidelijk. U geeft namelijk het volgende aan: '.....is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding').....'
U wordt verzocht dit te verhelderen.

Wij ontvangen graag de aanvullingen op uw advies.

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 e-mail adres)

De inhoud van dit bericht is vertrouwelijk en alleen bestemd voor de geadresseerde(n). Anderen dan de geadresseerde(n) mogen geen gebruik maken van dit bericht, het niet openbaar maken of op enige wijze verspreiden of vermenigvuldigen. Het UMCG kan niet aansprakelijk gesteld worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

The contents of this message are confidential and only intended for the eyes of the addressee(s). Others than the addressee(s) are not allowed to use this message, to make it public or to distribute or multiply this message in any way. The UMCG cannot be held responsible for incomplete reception or delay of this transferred message.



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: Interne RUG code **8079**
2. Titel van het project: **Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten**
3. Titel van de NTS: **Transplantatie model voor verschillende subtypen leukemie om behandelmethododes te kunnen verbeteren**
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: **24-01-2017**
 - termijnonderbreking(en) van / tot: **20-01-2017 tot 24-01-2017**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag: **24-01-2017**
 - advies aan CCD: **02-02-2017**
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: **20-01-2017**

Gestelde vraag/vragen:

- 1/ Gelieve in de bijlage de limiet aan de totale bloedafname middels de 3-4 wekelijkse bloedafnames (submandibulaire punctuur) te kwantificeren.
- 2/Het gebruik van 5 dieren per groep zou nader onderbouwd moeten worden.
- 3/U stelt onder B. De dieren: 'Als significantie bereikt is zullen geen verder proeven meer gedaan worden. De DEC vraagt zich af dit een juiste benadering is. Zou het niet beter zijn om de vraagstelling met een vooraf bepaalde power te benaderen?
- 4/De experimenten zullen bij vrouwtjes uitgevoerd worden. Zijn er verschillen te verwachten tussen mannen en vrouwen? Zullen de bevindingen uit de experimenten algemeen geldend zijn bij gebruik van enkel vrouwtjes c.q. zijn ze te generaliseren?

- Datum antwoord: **24-01-2017**

- Verstrek(e) antwoord(en):

- 1/ Dit is nu toegevoegd in de bijlage, pagina 3
- 2/ Dit is gebaseerd op onze ervaring in het verleden. We hebben de volgende zin toegevoegd, pagina 4 onderdeel biobanking, onderdeel target genen:
 - Uit onze ervaring van de afgelopen jaren blijkt dat 5 dieren per groep nodig is om reproduceerbare resultaten te genereren (rekening houdend met variatie tussen individuele muizen, foutenmarge bij het injecteren van cellen).
- 3/ Aangezien het pilotexperimenten betreft is het lastig om vooraf een poweranalyse te doen. Dit staat ook zo vermeld op pagina 5. Zo hebben we onze experimenten in het verleden ook altijd gedaan, en zien niet goed in hoe we dat nu anders zouden kunnen formuleren.
- 4/ Zoals al in de aanvraag vermeldt is het gebruik van vrouwtjes erop gebaseerd dat deze een betere "engraftment" van hematopoïetische (maligne) cellen vertonen (Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains; McDermott et al, 2010) en op de betere verdraagzaamheid van vrouwtjes in groepshuisvesting.
- In boven genoemde paper is ook de "engraftment" van de mannetjes beschreven. Tussen de geslachten werd vastgesteld dat vrouwtjes 1,4 keer betere "engraftment" vertonden als er meer dan 5000 cellen werden geïnjecteerd. Bij een lagere hoeveelheid cellen kon dat verschil oplopen tot 11 keer betere "engraftment" bij NSG vrouwtjes ten opzichte van NSG mannetjes, ondanks dat de NSG mannetjes ook duidelijke "engraftment" vertonden.
- Uitgaande van deze informatie is alleen voor het diermodel het vrouwtje een handigere keuze, door snellere en duidelijker resultaten en kunnen de gegevens ook vertaald worden naar de mannelijke muis. Uiteindelijk zijn de resultaten dus zeker te generaliseren.
- **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 een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De subdoelen zijn allemaal noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft zowel binnen de doelstellingen als tussen de doelstellingen criteria beschreven op basis van welke criteria deze zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC 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 van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

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).

Voorzover de DEC de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om deze strijdigheid met andere 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 1/ meer inzicht te krijgen in de mechanismen die ten grondslag liggen aan het ontstaan van leukemie en de ontwikkeling van resistentie tegen bestaande therapieën, en 2/om betere behandelmethoden tegen leukemie te kunnen ontwikkelen. Bovenstaande met gebruikmaking van het *in vivo* xenograft muismodel. Het uiteindelijke doel is om tot betere behandelmethoden te komen voor leukemie patiënten.

Er is deels een directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel want uit patiënten geïsoleerde leukemie cellen zullen worden getest in het muizenmodel. Het uiteindelijke doel zal waarschijnlijk binnen de looptijd van het project niet gehaald worden. Het project is gericht op fundamenteel

en translationeel onderzoek m.b.t. de hierboven beschreven (directe) doel. 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 fundamentele/translationele project, wat gericht is op onderzoek naar mechanismen bij het ontstaan van leukemie, ontwikkeling van resistentie tegen bestaande therapieën, en mogelijke betere behandelmethoden tegen leukemie in een *in vivo* xenograft model, 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 en levensverwachting van patiënten kan hierdoor verbeterd worden. Ook 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.

Voorzover de DEC de beschreven effecten op het milieu kan beoordelen is er 'geen aanleiding' (of 'aanleiding') om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. De DEC wil wel vooropstellen 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 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 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 zulks het geval is.**

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 bestraling, injectie van inhibitor (drugs) en maligne hematopoietische cellen, bloedafnames, scaffold implantatie en opoffering.**

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 leukemie ontwikkeling en behandeling (c.q. ontwikkeling van resistentie) zijn alleen na te bootsen in een gehumaniseerd muizenmodel.**

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 worden vrouwelijke dieren gebruikt. De onderzoeker heeft naar de mening van de DEC deze keuze in de projectaanvraag voldoende onderbouwd. 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 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, geef 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.

Rechtvaardigen de doelstellingen van het project "Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten", dat gericht is op de verbetering van de behandelmethoden van leukemie bij mensen en daarmee de vergroting van de kans op genezing bij dergelijke patiënten het matige ongerief, dat ongeveer 80% van de muizen wordt aangedaan dan wel licht ongerief bij de overige dieren in het onderhavige project?

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **matig nadeel.**

Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **potentieel groot voordeel.**

Algemeen: **vergroting van medische kennis met betrekking tot het ontstaan van leukemie en de behandeling daarvan, leidend tot een 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 "Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten" zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren. Voor de betrokken proefdieren leiden deze proeven, na licht dan wel 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 toedienen van maligne cellen al dan niet in combinatie met een scaffold, monitoring middels MRI en herhaalde bloedafname, het toepassen van conventionele en experimentele behandelingen en de opoffering aan het eind van de proeven. Dit zal ook repercussies hebben op hun natuurlijke gedrag.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project echter leiden tot een relevante uitbreiding van medisch-wetenschappelijke kennis over het ontstaan van leukemie. Voor de betreffende patiënten is verbetering van hun welzijn en mogelijk uitzicht op genezing van leukemie van groot belang. Dit verhoogt hun levensverwachting en geeft een betere kwaliteit van leven.

Vandaar dat de DEC-RuG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk, translationeel 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.

De DEC-RuG beantwoordt de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project "Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere

behandelmethode te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten”, dat gericht is op de verbetering van de behandeling van leukemie, de opoffering en het lichte dan wel 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. 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 “Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten” als ethisch gerechtvaardigd en voorziet de DEC-RuG derhalve het onderhavige projectvoorstel van een positief advies.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

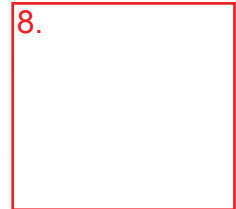
De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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, specificieer 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

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1

9713 AV GRONINGEN



02 MRT 2017

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

AVD105002017855

Bijlagen

1

Datum 1 maart 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 2 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten" met aanvraagnummer AVD105002017855. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

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

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

U kunt met uw project "Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 mei 2017 tot en met 30 april 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de vergunning niet voor langer dan 5 jaar mag worden afgegeven.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 2 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:
1 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD105002017855

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: Rijksuniversiteit Groningen

Adres: A. Deusinglaan 1 [REDACTED]

Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 mei 2017 tot en met 30 april 2022, voor het project "Onderzoek naar verschillende subtypen humane bloedkanker om betere behandelmethoden te kunnen ontwikkelen voor leukemiepatiënten" met aanvraagnummer AVD105002017855, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

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

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------|---------------|-------------|
| 3.4.4.1. Transplantatie model voor verschillende subtypen leukemie om behandelmethodes te kunnen verbeteren. | | | | |
| | Muizen (Mus musculus) / | 2.475 | 100% Matig | |

Voorwaarden

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

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

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

Aanvraagnummer:
AVD105002017855

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:

AVD105002017855

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:
AVD105002017855

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. | document NTS2017863 | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 | |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | x | | |
| 2 | NTS | x | | | | | | | | |
| 3 | Projectvoorstel | | | x | | | | | | |
| 4 | Bijlage | | | | x | x | | x | | |
| 5 | Ontvangstbevestiging en factuur | | | | x | | x | x | | |
| 6 | DEC-Advies | | | | x | | x | x | | |
| 7 | Advies CCD | | x | | | | | | | x |
| 8 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | | |

AVD 10300 2017 863



1.

15 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 0900-280028 (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 10800
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
 Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde: [Redacted]
 KvK-nummer: 30275924
 Straat en huisnummer: Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
 Postbus: 12007
 Postcode en plaats: 3501AA Utrecht
 IBAN: NL27INGB0000425267
 Tenaamstelling van het rekeningnummer: Universiteit Utrecht

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.

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters: [Redacted] Dhr. Mw.
 Functie: [Redacted]
 Afdeling: [Redacted]
 Telefoonnummer: [Redacted]
 E-mailadres: [Redacted]

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters: [Redacted] Dhr. Mw.
 Functie: PhD
 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 - 4 - 2017
- Einddatum 1 - 4 - 2018
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Het karakteriseren van de ontwikkeling van het innate immuunsysteem van vleeskuikens.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het in kaart brengen van de ontwikkeling van het innate immuunsysteem in vleeskuikens.
- 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 € 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

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

Utrecht
 07-02-2017



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.

Het voorliggende projectvoorstel is een uitvloeisel van het door NWO gefinancierde project "Optimizing Flock health and performance by influencing Immune Responsiveness and the gut Microbiome by nutritional interventions in Broilers (FIRM-broilers)". Dit NWO project heeft als doel om in vleeskuikens de interactie tussen het microbioom in de darm en de ontwikkeling van het immuunsysteem te bestuderen. Daarnaast wordt het effect van voerinterventies op de dynamiek van het microbioom in de darm en de ontwikkeling van het immuunsysteem onderzocht. Het uiteindelijke doel van het project is om door middel van voerinterventies de samenstelling van bacteriën in de darm zo te beïnvloeden dat het immuun systeem van de kip versterkt wordt waardoor de kuikens beter beschermd zijn tegen infecties.

Microbiota spelen een belangrijke rol in gezondheid en ziekte. Bij mensen is, onder andere mede dankzij het NIH Common Fund Human Microbiome Project, duidelijk geworden hoe belangrijk bacteriën in de darm kunnen zijn voor de algehele gezondheid. Ook bij vleeskuikens is de samenstelling en diversiteit van het kippen-darmmicrobiom (=verzameling darmmicrobiota) van invloed op essentiële fysiologische processen, zoals de ontwikkeling van de darmmorfologie, spijsvertering, immuunsysteem, toxine ontgiftiging, energiegebruik en groei (Kohl. *J Comp Physiol B* 2012 (182): 591-602; Wei et al. *Poult Sci* 2013 (92): 671-683; Stanley et al. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012 (96): 1361-1369). Het darmmicrobiom wordt bepaald door vele interacties tussen gastheer en omgevingsfactoren en varieert sterk binnen en tussen koppels vleeskuikens. Deze variatie is geassocieerd met verschillen in weerstand, voederconversie en groei/eindgewicht. Een efficiënte en geschikte methode om in koppels het darmmicrobiom te manipuleren is door middel van aanpassingen in diervoeders of het voermanagement (Choct. *Br Poult Sci* 2009 (50): 9-15; Lamot et al. *Poult Sci* 2014 (93): 2604-2614).

De interactie tussen darmmicrobiom en immuunsysteem is voornamelijk onderzocht in zoogdieren en weinig in vogels. Men veronderstelt dat deze interacties gelijk zijn in kippen, maar vanwege de beperkte beschikbaarheid van reagentia om het kippen immuun systeem te bestuderen was het eerder niet mogelijk om deze relatie te bestuderen.

Omdat het innate immuunsysteem juist in jonge kuikens een zeer belangrijke rol speelt, is het essentieel om ook in kippen de interactie tussen microbiom en de ontwikkeling van het immuunsysteem te bestuderen. Vervolgens wordt het effect van voerinterventies op de dynamiek van het microbiom in de darm en de ontwikkeling van het immuunsysteem onderzocht.

Eerder onderzoek heeft uitgewezen dat de ontwikkeling van immuunsysteem direct na uitkomst uit het ei wordt beïnvloed door voedingsstoffen en microbiota (Cunningham-Rundles et al. *J Allergy Clin Immunol* 2005 (115): 1119-1128, quiz 1129; Green et al. *Clin Exp Immunol* 2004 (136): 472-482; Bar-Shira et al. *Dev Comp Immunol* 2006 (30): 930-941; Yin et al. *ISME Journal* 2010 (4):367-376; Bar-Shira et al. *Dev Comp Immunol* 2003 (27): 147-157; Torok et al. *Appl Environ Microbiol* 2011 (77): 3380-3390). Hoewel de ontwikkeling van het immuunsysteem van de kip begint tijdens het embryonale leven, is het immuunsysteem nog niet volledig ontwikkeld als het kuiken uit het ei komt (Mast et al. *Vet Immunol Immunopathol* 1999 (70): 245-256). Het innate (aangeboren) immuunsysteem is al wel ontwikkeld als de kuikens uit het ei komen, maar de adaptieve (specifieke) immuunrespons komt pas na 2-3 weken op gang. Het aangeboren immuun systeem is dus de eerste afweer barrière tegen binnendringende pathogenen en speelt dan ook een belangrijke rol in de bescherming tegen infecties in het vroege leven van een kuiken. Daarnaast is het innate immuunsysteem belangrijk voor het op gang brengen van de adaptieve afweer reactie. Wanneer het innate immuunsysteem niet goed ontwikkeld is wordt het gat tussen het uitkomen uit het ei en de ontwikkeling van een volledig functioneel en geactiveerd specifiek immuunsysteem niet overbrugd. Dit zal resulteren in een verminderde weerstand van vleeskuikens met als gevolg infecties. Er is echter nog weinig specifieke kennis beschikbaar over de ontwikkeling van het innate immuunsysteem bij het kuiken. Het is dus van belang om meer kennis te verkrijgen over de ontwikkeling van het innate immuunsysteem, zodat de weerstand van de vleeskuikens wordt verhoogd.

Belangrijke componenten van het innate immuunsysteem zijn de NK cel en de DC. NK cellen spelen een rol in de eerste afweer reactie nadat een virus de gastheer binnenkomt door rechtstreeks geïnfecteerde cellen te doden (Trinchieri. *Adv Immunol* 1989 (47): 187-376; Lanier. *Annu Rev Immunol* 2005 (23): 225-274). Daarnaast zijn zowel NK cellen als DCs betrokken bij het initiëren van de adaptieve immuun

response (Raulet et al Nat Immunol. 2004;5(10):996-1002; Andoniou et al. Nat Immunol 2005 (6): 1011-1019). In de afgelopen jaren zijn technieken ontwikkeld om belangrijke cellen van het innate immuunsysteem zoals "natural killer" (NK) cellen en "dendritische cellen" (DC) van kippen te meten. Er zijn echter nog geen studies gedaan naar de ontwikkeling van NK cellen en DC in de darm en andere organen van kuikens. Een eerdere studie toonde aan dat darmweefsel van één-dag oude kuikens al verscheidene elementen bevatte van het aangeboren immuunsysteem, zoals receptoren en cel markers (Eren. Microsc Res Tech 2016 (79): 604-614). In deze pilot studie zal als eerste zowel tijdens de embryonale ontwikkeling als in kuikens worden onderzocht welke subtypen NK cellen voorkomen in verschillende organen. De ontwikkeling van het aangeboren immuunsysteem begint tijdens de embryonale fase en is volgroeid bij uitkomen uit het ei. Om de gehele ontwikkeling te kunnen onderzoeken is het van belang om de embryonale fase mee te nemen in experimenten naast de eerste levensdagen van de kuikens. Daarnaast wordt de aanwezigheid en activatie van DCs onderzocht. Omdat weinig bekend is over de ontwikkeling van het innate immuunsysteem in vleeskuikens zullen daarnaast andere immuun relevante organen zoals milt, beenmerg en lever worden bestudeerd. Op basis van deze resultaten kan een beeld gevormd worden van hoe het innate immuunsysteem in de darm zich ontwikkeld, en hebben we een "base line" voor toekomstige experimenten waarin het effect van interventies op deze ontwikkeling bestudeerd zal worden.

Deze toekomstige studies naar de interactie tussen microbiom en de ontwikkeling van het immuunsysteem en het effect van voer interventies op deze interactie zullen ondergebracht worden in een volgend projectvoorstel.

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het doel van dit project is om de ontwikkeling van het innate immuunsysteem in de darm en immuun relevante organen zoals milt, lever en beenmerg van vleeskuikens in kaart te brengen.

De onderzoekslijn naar kippen NK cellen is opgezet in 2007. Op dit moment is dit een van de belangrijkste onderzoeklijnen in de aviaire immunologie groep. Na het ontwikkelen van testen om de aanwezigheid en de activiteit van NK cellen te meten (Jansen et al, DCI 2010) zijn deze technieken in verschillende studies toegepast. In deze studies is de rol van NK cellen tijdens infecties met virussen zoals IBV en vogelgriepvirus bestudeerd (Vervelde et al, Vet Immunol Immunopathol 2013, Jansen et al Sci Reps 2013). Ook heeft de aviaire immunologie groep verschillende assays ontwikkeld om de aanwezigheid en activatie van kippen DCs te meten (de Geus et al, JI 2012). Met onze ruime ervaring die op het gebied van dierexperimenten met kippen en het bestuderen van het kippen innate immuunsysteem zal dit ertoe leiden dat de studies in deze aanvraag afgerond zullen zijn voor het eind van de periode waarvoor toestemming wordt gevraagd.

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk belang:

Er is weinig bekend over NK cel biologie in kippen. Tot nu toe zijn verschillende populaties NK cellen beschreven in longen, bloed en milt van leghennen en in de milt van kippen embryo's. Een studie waarin in detail wordt gekeken naar NK cel subtypen in verschillende organen van vleeskuikens en kippen embryo's en naar hoe kippen NK cellen migreren van het ene naar het andere orgaan is niet eerder uitgevoerd. Ook over kippen DCs, hun migratie en activatie is weinig bekend. Deze studie zal zeker bijdragen aan meer kennis op het gebied van het innate immuunsysteem in de kip.

Maatschappelijk belang:

Een goede ontwikkeling van het immuunsysteem van kuikens zal ervoor zorgen dat deze al vanaf jonge leeftijd kan optreden tegen ziekteverwekkers. Hiermee wordt ook de kans op het oplopen van infecties die bij de mens tot voedselinfecties kunnen leiden (zoals Salmonella en Campylobacter) verminderd. Ook zullen kippen die gezond zijn minder snel worden behandeld met antibiotica. Gezondere koppels pluimvee zorgen dus voor minder kans op overdracht van dierziekten of antibioticaresistentie van dier naar de mens via onder andere de consumptie van vlees.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Aanpak:

Eieren afkomstig van een commerciële boerderij worden getransporteerd naar de onderzoeksfaciliteiten van de faculteit diergeneeskunde. Hier worden de eieren bebroed tot het gewenste embryonale stadium of tot uitkomst. Na uitkomst worden de kuikens in een experimentele stal geplaatst en verzorgd. Om een beeld te krijgen van de ontwikkeling van het innate immuunsysteem worden vleeskuikens op verschillende leeftijden gedood. Vervolgens wordt darm materiaal verzameld, en wordt materiaal van andere immuun relevante organen zoals milt, lever en beenmerg geïsoleerd. Het is helaas niet mogelijk om alle immuun relevante organen te bestuderen gezien de complexiteit van de isolatie procedures en de assays. Als mucosaal immuunorgaan is de darm het meest relevant omdat in vervolg experimenten de interactie tussen immuunsysteem en microbiota wordt onderzocht. De overige selectie van organen is gebaseerd op waar de mogelijkheid ligt om NK cellen en DCs te meten. Immuuncellen worden geïsoleerd uit de organen en vervolgens wordt de aanwezigheid en activiteit van de NK cellen en DCs bestudeerd. Deze experimenten zullen laten zien waar en wanneer de cellen van het innate immuun systeem zich ontwikkelen.

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

1. Om de ontwikkeling van het innate immuunsysteem in vleeskuikens in kaart te brengen, zullen NK cellen en DCs worden geïsoleerd uit de darm en verschillende organen zoals beenmerg, milt en lever van vleeskuiken embryo's en 1-7 en 14 en 21 dagen oude kuikens. Dag 1 is de dag van uitkomst. In deze experimenten zullen kippen embryo's van 14, 16, 18 en 20 dagen en kuikens van 1, 3, 5, 7, 14 en 21 dagen worden doodgemaakt. De genoemde organen zullen worden verzameld voor de isolatie van leukocyten. NK-cel subsets zullen worden bepaald met behulp van flowcytometrie na kleuring van de cellen met NK cel specifieke markers. Daarnaast zal de activiteit, cytokine productie en 'killing' capaciteit van NK cellen worden gemeten met behulp van verschillende assays. Ook wordt de lokalisatie en co-lokalisatie van NK cellen met andere immuun cellen bepaald door middel van immunohistochemistry. Ook zal de aanwezigheid van DC's worden bepaald met behulp van flowcytometrie na kleuring met specifieke markers. Daarnaast zal de activiteit van DC's worden gemeten met een assay en co-lokalisatie met andere immuun cellen door middel van immunohistochemistry.

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

1. Het in kaart brengen van NK cellen in verschillende organen zal aantonen waar de ontwikkeling van NK cellen plaatsvindt en hoe NK cellen door het lichaam van de kip migreren.
2. Het bestuderen van de aanwezigheid en activatie van DCs zal aantonen wat de wisselwerking is tussen NK cellen en DCs en hoe ze elkaar beïnvloeden.

De wisselwerking tussen NK cellen en DC's is optimaal bij cel-cel contact. Aanwezigheid van beide cellen (dichtbij elkaar) en activatie markers op de cellen zullen een beeld geven van de interactie tussen NK cellen en DC's.

Milestone 1: het in kaart brengen van de ontwikkeling van NK cellen in kippen embryo's en jonge kuikens
Milestone 2: het in kaart brengen van DCs in kippen embryo's en jonge kuikens

De resultaten uit deze pilot studie zullen gebruikt worden voor vervollexperimenten, die niet onder deze projectvergunningaanvraag zijn opgenomen, maar wel onderdeel worden van het onderzoeksproject (FIRM-Broilers).

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Het in kaart brengen van de ontwikkeling van het innate immuunsysteem in kippen embryo's en jonge kuikens |
| 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. | 10800 | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Universiteit Utrecht | | | | |
| 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | <table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>3.4.4.1</td><td>Het in kaart brengen van de ontwikkeling van het innate immuunsysteem in kippen embryo's en jonge kuikens</td></tr></tbody></table> | Volgnummer | Type dierproef | 3.4.4.1 | Het in kaart brengen van de ontwikkeling van het innate immuunsysteem in kippen embryo's en jonge kuikens |
| Volgnummer | Type dierproef | | | | |
| 3.4.4.1 | Het in kaart brengen van de ontwikkeling van het innate immuunsysteem in kippen embryo's en jonge kuikens | | | | |

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Om de ontwikkeling van NK cellen en DCs in kaart te brengen, worden deze cellen geïsoleerd uit organen zoals beenmerg, milt, bloed en darm van kippen embryo's en kuikens. Vleeskuiken embryo's van 14 dagen, 16 dagen, 18 dagen en 20 dagen oud en kuikens van 1, 3, 5, 7, 14 en 21 dagen oud worden doodgemaakt. Organen worden verzameld en in het lab worden uit de verschillende organen de leukocyten geïsoleerd voor verder onderzoek.

De keuze voor de tijdstippen waarop de embryo's/kuikens gedood worden is bepaald om zo nauwkeurig mogelijk de innate response in beeld te krijgen en veranderingen in deze response in toekomstige experimenten. Het is bekend dat de adaptieve afweer in jonge kuikens nog niet ontwikkeld is, deze komt pas na een week of drie op gang. In deze eerste periode is het innate immuun systeem dus erg belangrijk in de bescherming tegen ziekteverwekkers. Om een beeld te krijgen van de frequentie en functie van NK cellen en DCs is gekozen voor een studie waarin de cellen elke twee dagen bestudeerd worden gedurende een week en op 14 en 21 dagen.

ED14: Er is bekend dat in embryo's van 14 dagen de milt uitsluitend NK cellen bevat. NK cellen uit de milt van embryo's van deze leeftijd zijn door ons uitgebreid bestudeerd dus de normale waarden voor de frequentie en functie van deze NK cellen zijn bekend. Dit is het uitgangspunt van onze studie. Ook wordt er gekeken naar aanwezigheid en activiteit van DCs.

ED16-ED20: Om de ontwikkeling van ED16 naar ED20 te kunnen bestuderen en wat te kunnen leren over veranderingen in frequentie en functie van embryonale NK cellen en DCs.

Dag 1-3-5-7: Om na uitkomst uit het ei de ontwikkeling te kunnen bestuderen en wat te kunnen leren over veranderingen in frequentie en functie van NK cellen en DCs.

Dag 14-21: Weergeven van de verhouding tussen NK cellen en DCs, wanneer het adaptieve immuunsysteem begint te ontwikkelen.

Primaire uitkomst parameters:

- De frequentie van NK cellen gemeten met behulp van markers voor kippen NK cellen
- De frequentie van DCs met behulp van bijpassende markers
- De activiteit van NK cellen (bepaling van de expressie van CD107, een eiwit wat op de buitenkant van geactiveerde NK cellen zit; productie van IFN γ)
- De activiteit van DCs met behulp van markers die de activatie van DC's aantonen

De frequentie van cellen is erg afhankelijk van andere cellen die aanwezig zijn. Naast het meten van de percentages cellen worden de organen gewogen voor de cellen geïsoleerd worden, zodat uiteindelijk het aantal cellen per gram weergegeven kan worden.

Tijdens de analyses nemen we ook parameters mee van het adaptieve immuunsysteem, zoals B en T cellen. Gezien de complexiteit van de assays is het niet mogelijk om ook de functie van B en T cellen in detail te bestuderen. Wel zal de aanwezigheid van B en T cellen en de activatie van CD8+ T cellen gemeten worden met behulp van flowcytometrie.

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 eieren worden uitgebroed. De kippen ontvangen geen verder behandeling. Op verschillende tijdstippen worden de kippen doorgemaakt door cervicale dislocatie of elektrocutie gevolgd door verbloeding.

Onderbouwing:

Op verschillende dagen wordt de NK cel response gemeten, als mede van DCs om te onderzoeken hoe het innate en adaptieve immuunsysteem zich ontwikkelt in embryo's en jonge kuikens. In deze pilot studie zal gekeken worden hoe de natuurlijke ontwikkeling verloopt, dus van de immuun cellen in embryo's en kuikens die geen behandeling hebben ontvangen.

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

Dit is een pilot studie waarin voor het eerst naar de ontwikkeling van NK cellen en DCs wordt gekeken in deze organen van vleeskuikens. Uit een eerdere pilot studie waarin gekeken is naar NK cellen in de darm van 2 en 4 weken oude dieren, is bekend dat met 3 dieren per groep een betrouwbare analyse uitgevoerd kan worden met betrekking tot de aanwezigheid, functie en activatie van cellen. Ook is bekend uit een eerder experiment waarin gekeken is naar immuun cellen in de darm van één dag oude kuikens dat het aantal cellen per orgaan op deze leeftijd erg laag is. Om een betrouwbare meting te kunnen doen moeten cellen van tenminste drie één dag oude kuikens gecombineerd worden en zijn er in totaal op dit tijdstip 9 kuikens nodig. Uit een eerder experiment is ook gebleken dat vanaf dag 3 voldoende cellen te isoleren zijn uit individuele dieren.

Op advies van de IvD is het aantal benodigde dieren per groep verhoogd naar 5 in verband met mogelijke uitval die voor kan komen op deze leeftijden en omdat in dit experiment ook jongere kuikens gebruikt worden dan in het experiment waarnaar verwezen wordt. Voor één dag oude kuikens betekent dit dat er in totaal 15 kuikens nodig zijn om een betrouwbare analyse uit te voeren.

In deze pilot studie wordt fundamenteel onderzoek gedaan en wordt het microbiom nog niet meegenomen als interventie, dit zal in vervolg projecten gaan plaatsvinden. Daardoor is de variatie van het microbiom in deze pilot nog niet van belang, maar er zal in vervolgstappen rekening worden gehouden met de grote variatie en aantallen dieren die nodig zijn voor een statistische onderbouwing. In overleg met de IvD is het aantal dieren voor deze fundamentele pilotstudie opgehoogd naar 5 kuikens per tijdstip en dit aantal geeft een voldoende statistische onderbouwing.

In totaal gaat het dus om de volgende aantallen:

1 dag oud: 5 kuikens (x drie om voldoende cellen te hebben) = 15

3 dagen oud: 5 kuikens (vanaf deze leeftijd is het mogelijk om voldoende cellen te isoleren uit individuele dieren)

5 dagen oud: 5 kuikens

7 dagen oud: 5 kuikens

14 dagen oud: 5 kuikens

21 dagen oud: 5 kuikens

In totaal: 40 kuikens

B. De dieren

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

40 eieren van vleeskuikens afkomstig van een commerciële boerderij van het ras Ross. Deze eieren worden getransporteerd naar de onderzoeksfaciliteiten van de faculteit diergeneeskunde. Hier worden de eieren bebroed tot uitkomst en na uitkomst worden de kuikens in een experimentele stal geplaatst en verzorgd tot de gewenste leeftijd. Per tijdstip zullen alle 5 kuikens (dag 1: 15) worden gebruikt, er blijven geen dieren over. Er is geen voorkeur voor een geslacht aangezien beide geslachten in de praktijk worden gebruikt en er in eerdere studies geen verschillen in immuun responses zijn gemeten tussen hennen en hanen. We werken met het geslacht wat uitkomt uit het ei. Er is voor vleeskuikens gekozen omdat in dit project wordt gestreefd naar een verbetering van de huidige weerstand in vleeskuikens. De keuze voor het gebruik van dit ras is gebaseerd op het feit dat deze kippen het meest in de praktijk gebruikt worden, zodoende wordt er zo dicht mogelijk bij de praktijk situatie gebleven. Daarnaast is dit ras hetzelfde als wordt gebruikt in experimenten van ██████, het bedrijf waar dit project mee samenwerkt.

Het doel van dit project is de ontwikkeling van het innate immuunsysteem in kaart te brengen in deze kippen. Het is interessant om de ontwikkeling in verschillende rassen te bestuderen en te vergelijken, maar dat valt buiten de scope van deze studie. Ook variatiefactoren als verschillende bedrijven en omstandigheden zijn niet relevant in deze pilotstudie.

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:

Voor het testen van de activiteit van het immuun systeem is het noodzakelijk om cellen vers uit een dier te verkrijgen. Inzicht verkrijgen in immuun responsen kan deels middels computermodellen, echter voor de kip zijn computermodellen van immuun responsen nog niet beschikbaar. Het meten van de daadwerkelijk functionele activiteit dient nog steeds getest te worden met levende cellen.

Vermindering:

Het is voornamelijk niet mogelijk aan de hand van statistische berekeningen vast te stellen hoeveel dieren exact gebruikt moeten worden. De benodigde aantallen zijn gebleken uit eerdere experimenten waar 3 dieren per groep een goed beeld geeft. In overleg met de IvD is dit aantal opgehoogd naar 5 dieren per groep. Daarnaast moeten op dag 1 drie kuikens gecombineerd worden voor een betrouwbare meting en zijn er in totaal op dit tijdstip 15 kuikens nodig om een goed beeld te krijgen van de aanwezigheid en functie/activatie van cellen. Hierdoor worden er niet meer dieren dan nodig ingezet.

Verfijning:

- De vleeskuikens worden veelvuldig gecontroleerd op gezondheid en welzijn en er wordt gezorgd voor adequate voer- en watervoorziening en een goed klimaat.
- Het vleeskuiken is het doeldier binnen dit project, waardoor de uitkomsten makkelijk vertaalbaar zijn naar de uiteindelijke toepassing in de praktijk.

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.

1. De dieren worden in groepen gehouden in een omgeving die in ieder geval aansluit bij hun basisbehoeften wat betreft management van klimaat, licht, strooisel, voer en watervoorziening.
2. Het welzijn en de gezondheid van de dieren wordt elke dag gecontroleerd. Hierdoor worden eventuele welzijnsaantastingen snel gesignaleerd en kan snel worden ingegrepen door aanpassingen in het management, een passende behandeling of euthanasie.

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.

Niet van toepassing.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Wanneer wordt waargenomen dat:

- een dier niet in staat is zelfstandig het voer en/of drinkwater tot zich te nemen;
- een dier ernstig ziek is, ernstig verwond is of ernstige pijn vertoont; wordt overgegaan tot euthanasie.

Hierbij wordt als algemeen criterium het "analogieprincipe" gehanteerd, hetgeen inhoudt dat men ervan uitgaat dat handelingen of toestanden die bij de mens als pijnlijk worden ervaren ook door dieren als pijnlijk zullen worden ervaren. Voor kippen geldt dat zij niet snel ziekte, pijn of verwondingen zullen laten zien. Wanneer wel verschijnselen getoond worden, moet dit als serieus tot ernstig geïnterpreteerd worden en worden de dieren nader bekeken. Gewichtsverlies is bij vleeskuikens niet zo'n bruikbare parameter omdat vanwege hun hoge groeisnelheid er al sprake kan zijn van ongerief als de dieren achterblijven in groei. Wanneer dieren achter lijken te blijven in gewicht worden deze dieren extra geobserveerd en wordt de kropvulling met regelmatige tussenpozen beoordeeld. Wanneer er niet of nauwelijks voer wordt opgenomen gedurende 2 opeenvolgende dagen en dit niet verbetert, wordt overgegaan tot euthanasie.

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

< 1%

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.

Transport en binnenbrengen van de kuikens in de stal: licht ongerief
Labelen van de kuikens door middel van wingtags: licht ongerief
Doodmaken: licht ongerief

Cumulatief: 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 het onderzoek zijn cellen uit organen nodig. Het is niet mogelijk deze organen te isoleren uit levende dieren.

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



5.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002017863

Bijlagen

2

Datum 9 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 7 februari 2017. Het gaat om uw project "Het karakteriseren van de ontwikkeling van het innate immuunsysteem van vleeskuikens". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002017863. 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:

9 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD108002017863

Datum:
9 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017863

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 30275924
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
9 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017863

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: PhD
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 april 2017
Geplande einddatum: 1 april 2018
Titel project: Het karakteriseren van de ontwikkeling van het innate immuunsysteem van vleeskuikens
Titel niet-technische samenvatting: Het in kaart brengen van de ontwikkeling van het innate immuunsysteem in vleeskuikens
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

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:

Utrecht

Datum:

7 februari 2017

Datum:

9 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD108002017863



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002017863
Bijlagen
2

Datum 9 februari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 9 februari 2017
Vervaldatum: 11 maart 2017
Factuurnummer: 170863
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

| Omschrijving | Bedrag |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002017863 | € 568,00 |

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.

6.



A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2016.II.811.030
2. Titel van het project : Het in kaart brengen van de ontwikkeling van het innate immuunsysteem in kippen embryo's en jonge kuikens
3. Titel van de NTS : Het in kaart brengen van de ontwikkeling van het innate immuunsysteem in vleeskuikens

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: 06-01-2017
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 18-01-2017
- anderszins behandeld:
- termijnonderbreking(en) van / tot : 24-01-2017/31-01-2017
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 06-02-2017

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: 24-10-2017
- Datum antwoord: 31-01-2017

- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: De DEC zou graag de samenhang met uw vorige project (*Natural killer cells as potential biomarkers of immune system development in chickens*) duidelijker beschreven zien, zulks om mogelijke 'overlap' te voorkomen.
In het vorige project gaat het om de ontwikkeling van NK cellen in leghennen, in dit project gaat het om vleeskuikens. De opzet van het dierexperiment en de technieken die gebruikt worden om de NK cellen te meten komen overeen, maar het gaat om twee totaal verschillende soorten kippen die ook genetisch van elkaar verschillen. Vleeskuikens worden geselecteerd op maximale vleesproductie in een zo kort mogelijke tijd, leghennen op maximale eiproductie. Verschillende studies hebben laten zien dat het selecteren op deze eigenschappen ook het immuunsysteem heeft beïnvloed. Miltcellen van vleeskuikens bevatten minder pro-inflammatoire cytokines (Leshchinsky et al, Dev. Comp. Immunol 2001) en delen minder na stimulatie met ConA (Koenen et al, Vet Immunol 2002). Ook hebben vleeskuikens meer IgM en minder IgY (Koenen et al). Mogelijke verschillen in NK cel frequentie en functie tussen leghennen en vleeskuikens zijn nog niet onderzocht. Vandaar dat de ontwikkeling van NK cellen in het vorige project niet zomaar als baseline kan dienen voor de ontwikkeling van NK cellen in vleeskuikens.

Bijlage 1

- B. De dieren: De herkomst van de dieren is niet helemaal duidelijk. U zegt dat de vleeskuikens afkomstig zijn van een commerciële boerderij, maar de DEC vraagt zich af of u niet bedoeld dat de eieren afkomstig zijn van een commerciële boerderij en u de eieren zelf laat uitbroeden in isolatoren. Indien dat correct is, dan dient dat duidelijker in de aanvraag vermeld te worden.
Deze veronderstelling is correct en dit is duidelijker onder B. De dieren vermeld.
- B. De dieren: Daarnaast gaat de DEC ervan uit dat rekening wordt gehouden met een uitvalpercentage van ca. 10% en er dus meer dan 40 eieren uitgebroed zullen worden. Wat doet u met de dieren die eventueel over zijn?
Er is inderdaad rekening gehouden met een uitvalpercentage van 10% en dit is al meegerekend in het aantal eieren dat wij nodig hebben. Dit is onder A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters, laatste onderdeel, vermeld. Voor een betrouwbaar resultaat hebben we 3 kuikens nodig per tijdstip, en dit is (op advies van IvD) opgehoogd naar 5 kuikens per tijdstip. Per tijdstip worden alle kuikens gebruikt en zullen er geen dieren over blijven, dit is aangevuld onder B in rood.

Niet Technische Samenvatting

- 3.1 Beschrijving doelstellingen: De informatie over de darmbacteriën is geen onderdeel van dit project. De DEC raadt u aan om dit uit de NTS te verwijderen.
De eerste twee alinea's onder 3.1 zijn verwijderd uit de NTS.

- 4.3 Verfijning: U spreekt hier over 'voerinterventies'. Dit komt voor de DEC uit de lucht vallen omdat het nergens in het projectvoorstel wordt genoemd. Graag verhelderen en/of verwijderen uit de NTS.

Met 'voerinterventies' wordt hier verwezen naar toekomstige experimenten, nu niet van toepassing. Dit is verwijderd uit de NTS.

- 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 is bekend dat de samenstelling van het darmmicrobioom zowel in mensen als in dieren grote invloed heeft op allerlei fysiologische processen, waaronder de ontwikkeling van het aangeboren immuunsysteem. Er zijn aanwijzingen dat ook in vleeskuikens sprake is van een dergelijke invloed, maar fundamentele kennis op dat gebied ontbreekt nog. Er is behoefte aan dergelijke kennis, omdat een optimale ontwikkeling van het aangeboren immuunsysteem bijdraagt aan optimaal presterende koppels vleeskuikens in termen van gezondheid, welzijn en efficiënte groei. Wanneer bekend is hoe de ontwikkeling van het aangeboren immuunsysteem in vleeskuikens verloopt, en ook hoe deze beïnvloed wordt door het darmmicrobioom, dan kan men mogelijk in de toekomst met behulp van voederinterventies een optimale ontwikkeling van het aangeboren immuunsysteem in vleeskuikens ondersteunen. De eerste stap die nodig is om de effectiviteit van dergelijke voederinterventies te kunnen onderzoeken – het in kaart brengen van de ontwikkeling van het aangeboren immuunsysteem in vleeskuikens – is het doel van de voorliggende projectaanvraag.

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 in kaart brengen van het aangeboren immuunsysteem van vleeskuikens. Het uiteindelijke doel van het project is het vinden van aanknopingspunten voor de toekomstige ontwikkeling van voederinterventies, die de samenstelling van het darmmicrobioom zodanig kunnen beïnvloeden, dat het aangeboren immuunsysteem van vleeskuikens optimaal tot ontwikkeling komt. Voordat de werkzaamheid van dergelijke voederinterventies onderzocht kan worden is het noodzakelijk dat in eerste instantie de ontwikkeling van het aangeboren immuunsysteem van vleeskuikens in detail onderzocht wordt (het doel van deze projectaanvraag), en in tweede instantie de interacties tussen het darmmicrobioom en het aangeboren immuunsysteem (het doel van een andere projectaanvraag). De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren en het onderzoeksveld, en op de lange termijn de doelgroep (de pluimveehouderij) en de diervoederindustrie. De morele waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: welzijn (stress) en rechtvaardigheid (intrinsieke waarde en integriteit). De morele waarden die voor de doelgroep worden bevorderd zijn: welzijn en rechtvaardigheid (beschikbaarheid van effectieve voederinterventies). De morele waarden die voor het onderzoeksveld en de diervoederindustrie worden bevorderd zijn: welzijn (wetenschappelijke en commerciële ontwikkelingen).
6. Er is geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met immunologisch onderzoek in kippen en met de uit te voeren experimentele handelingen. 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. Gezien het feit dat dit projectvoorstel onderdeel is van een groter NWO-project zou het haalbaar moeten zijn dat de resultaten van dit project op termijn leiden tot de ontwikkeling van eerdergenoemde voederinterventies voor vleeskuikens.
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. De ontwikkeling van het aangeboren immuunsysteem wordt in de darm en immuungerelateerde organen zoals milt, lever en beenmerg onderzocht. Daartoe worden embryo's en jonge kuikens op verschillende tijdstippen geëuthanaseerd en relevante weefsels

en organen uit de dieren geïsoleerd. Vervolgens wordt de hoeveelheid, functie en activiteit van dendritische cellen (DC) en verschillende subtypen 'natural killer' cellen (NK cellen) in de geïsoleerde weefsels en organen in kaart gebracht.

Welzijn dieren

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

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

De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de dierproeven, voor de desbetreffende categorie, genoemde beperkende voorwaarden. Het doeldier van de op termijn te ontwikkelen voederinterventies is het vleeskuiken. Het spreekt voor zich dat het voorbereidende fundamenteel wetenschappelijke onderzoek in dezelfde diersoort uitgevoerd wordt. Eieren worden aangekocht van een commerciële broederij en binnen de onderzoeksfaciliteit uitgebroed.

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.

11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor alle dieren geldt dat zij licht ongerief zullen ervaren als gevolg van het verplaatsen naar de stal nadat de vleeskuikens uit het ei zijn gekomen, van het aanbrengen van de *wingtags* en van de euthanasie.

12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast. De dieren worden gedood om organen, weefsels en cellen te kunnen isoleren.

13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. Men houdt er rekening mee dat minder dan 1% van de dieren uitvalt om redenen die niet gerelateerd zijn aan de dierproef.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Om de ontwikkeling van het aangeboren immuunsysteem in kaart te kunnen brengen is het vooralsnog noodzakelijk om de te onderzoeken cellen rechtstreeks uit een dier te isoleren en *ex vivo* te onderzoeken. Computermodellen die interacties tussen cellen, weefsels en organen kunnen voorspellen zijn nog niet beschikbaar voor de kip. De fundamentele kennis die daarvoor nodig is is nog niet beschikbaar, en wordt juist met behulp van het voorliggende project vergaard.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. De berekening van het benodigde aantal dieren is gebaseerd op ervaringen met eerder uitgevoerde experimenten. Deze hebben uitgewezen dat met 3 dieren per groep een betrouwbare analyse uitgevoerd kan worden met betrekking tot de hoeveelheid, functie en activiteit van cellen. Op advies van de IvD is dit aantal verhoogd naar 5 dieren per groep, zodat men voldoende dieren per groep overhoudt wanneer sprake is van – niet aan de dierproef gerelateerde – uitval. Voor de kuikens die één dag oud zijn zijn meer dieren per groep nodig, omdat de celopbrengst uit kuikens van deze leeftijd dusdanig laag is dat men niet kan volstaan met 5 dieren per groep. Om betrouwbare resultaten te kunnen behalen moeten cellen van 3 kuikens gecombineerd worden en zijn in totaal voor deze leeftijdscategorie drie keer zoveel (dus $3 \times 5 = 15$) dieren nodig.
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.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood, omdat de doelstellingen van het project alleen behaald kunnen worden door verschillende organen, weefsels en cellen rechtstreeks uit embryo's en kuikens te isoleren. De dieren worden volgens een passende en in bijlage IV van de EU richtlijn genoemde methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel kippen worden aangevraagd is de vraag over herplaatsing/hergebruik niet van toepassing.

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

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag luidt: rechtvaardigt het belang van het voorliggende project, dat tot doel heeft de ontwikkeling van het aangeboren immuunsysteem van vleeskuikens in kaart te brengen, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren?
2. In het voorliggende project wordt het welzijn en de integriteit van jonge vleeskuikens aangetast, wat gepaard gaat met licht ongerief. Daar staat tegenover dat van dit project verwacht mag worden dat het fundamentele kennis oplevert over de ontwikkeling van het aangeboren immuunsysteem van vleeskuikens. De DEC kent daar veel gewicht aan toe. Op de korte termijn kan met behulp van deze kennis daarop voortbordurend fundamenteel wetenschappelijk onderzoek uitgevoerd worden, gericht op de interactie tussen het darmmicrobioom en het aangeboren immuunsysteem van het vleeskuiken. Op de langere termijn kan het voorliggende project van belang zijn voor de pluimveehouderij, omdat met behulp van deze kennis mogelijk voederinterventies ontwikkeld kunnen worden die een optimale ontwikkeling van vleeskuikenkoppels ondersteunen. Niet alleen de dieren en directe betrokkenen binnen de pluimveehouderij zouden daar baat bij hebben, ook de samenleving. Jonge vleeskuikens met een goed functionerend aangeboren immuunsysteem zijn namelijk minder vatbaar voor infecties. Dat draagt op zijn beurt bij aan een duurzame pluimveehouderij – in termen van gezondheid, welzijn en efficiënt grondstoffengebruik, en ook in termen van antibioticumgebruik. Een gezondere veestapel maakt gereduceerd antibioticumgebruik mogelijk en verkleint zo de kans op overdracht van antibioticumresistentie naar mensen. Daarnaast wordt ook de kans op overdracht van ziekteverwekkers die bij de mens tot voedselinfecties kunnen leiden gereduceerd.
Het is aannemelijk dat deze fundamentele – en op termijn ook de toegepaste – doelstellingen behaald zullen worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Dat het voor de individuele onderzoeker van belang kan zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken is juist, maar speelde voor de DEC bij het maken van de ethische afweging geen rol van betekenis. Net zomin als het feit dat het voor de diervoederindustrie van belang kan zijn om eerdergenoemde voederinterventies te kunnen ontwikkelen.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het in kaart brengen van het aangeboren immuunsysteem van vleeskuikens een reëel belang vertegenwoordigt en dat dit reële belang opweegt tegen de aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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



8.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD108002017863

Bijlagen

1

Datum 1 maart 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 7 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het karakteriseren van de ontwikkeling van het innate immuunsysteem van vleeskuikens" met aanvraagnummer AVD108002017863. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

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

U kunt met uw project "Het karakteriseren van de ontwikkeling van het innate immuunsysteem van vleeskuikens" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 april 2017 tot en met 1 april 2018.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 6 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.

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.

Datum:
1 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017863

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Universiteit Utrecht
Adres: Postbus 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 april 2017 tot en met 1 april 2018, voor het project "Het karakteriseren van de ontwikkeling van het innate immuunsysteem van vleeskuikens" met aanvraagnummer AVD108002017863, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Assistent professor. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 7 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 7 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 7 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 6 februari 2017, ontvangen op 7 februari 2017.

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------|------------|-------------|
| 3.4.4.1 Het in kaart brengen van de ontwikkeling van het innate immuunsysteem in kippen embryo's en jonge kuikens | | | | |
| | Kippen / Ross | 40 | 100% Licht | |



Aanvraagnummer:

AVD108002017863

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:

AVD108002017863

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 2017865 | 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 | Bijlage 4 | | | | x | x | x | x | | |
| 8 | Ontvangstbevestiging en factuur | | | | x | | x | x | | |
| 9 | DEC advies | | | | x | x | x | x | | |
| 10 | Verzoek om aanvullende informatie | | | | x | | x | x | | |
| 11 | Antwoord op verzoek om aanvullende informatie | | | | x | x | x | x | | |
| 12 | Advies CCD | | x | | | | | | | x |
| 13 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | | |



13 FEB 2017

1.

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website www.zbo-ccd.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 | 10300 |
| | | <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 Katholieke Universiteit Nijmegen |
| | | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | Instantie voor dierenwelzijn |
| | | KvK-nummer | 4 1 0 5 5 6 2 9 |
| 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 | Geert Groteplein 10 |
| | | Postbus | 9101, t.a.v. [redacted] |
| | | Postcode en plaats | 6500HB Nijmegen |
| | | IBAN | NL90ABNA0231209983 |
| | | Tenaamstelling van het rekeningnummer | UMC St Radboud |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker. | (Titel) Naam en voorletters | [redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
| | | Functie | [redacted] |
| | | Afdeling | [redacted] |
| | | Telefoonnummer | [redacted] |
| | | E-mailadres | [redacted] |
| 1.5 | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker. | (Titel) Naam en voorletters | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| | | Functie | |
| | | Afdeling | |
| | | Telefoonnummer | |
| | | E-mailadres | |

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | [REDACTED] | |
| Afdeling | [REDACTED] | |
| Telefoonnummer | [REDACTED] | |
| E-mailadres | instantievoordierenwelzijn@radboudumc.nl | |
- 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 0 _ 0 3 _ 2 0 1 7 |
| Einddatum | 1 0 _ 0 3 _ 2 0 2 2 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Myelination in schizophrenia: mechanisms and therapeutics
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Myelinatieveranderingen in schizofrenie: mechanismen en behandelingen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------------------------------|
| Naam DEC | RU DEC |
| Postadres | Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED] |
| E-mailadres | [REDACTED] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- 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.

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------|------|
| <input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.684,00 | Lege |
| <input type="checkbox"/> Wijziging € | Lege |
| <input type="checkbox"/> Via een eenmalige incasso | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Na ontvangst van de factuur | |

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

| |
|-------------------------------------------------------------------|
| Verplicht |
| <input checked="" type="checkbox"/> Projectvoorstel |
| <input checked="" type="checkbox"/> Niet-technische samenvatting |
| Overige bijlagen, indien van toepassing |
| <input type="checkbox"/> Melding Machtiging |
| <input checked="" type="checkbox"/> DEC-advies, factuurinformatie |

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 1.6). 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 | Nijmegen |
| Datum | 10 - 02 / 2017 |
| Handtekening | [Redacted] |

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'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Myelination in schizophrenia: mechanisms and therapeutics |

2 Categories

- | | | |
|-----|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research <input type="checkbox"/> Translational or applied research <input type="checkbox"/> Regulatory use 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.
-

Myelination in schizophrenia: mechanisms and therapeutics

Schizophrenia

The neuropsychiatric disorder schizophrenia (SZ) has a prevalence of 1% worldwide and is characterized by three different symptom categories: positive symptoms (hallucinations, delusions etc.), negative symptoms (depressive like symptoms including anhedonia and social isolation), and cognitive symptoms (executive functioning deficits, trouble with learning, memory and decision making). Current treatment targets only positive symptoms, hence patients experience a high disease burden and cannot function in daily life. In addition to that, SZ has a high economic cost; treatment expenses, and effects on work and family add up to €93.9 billion per year in Europe (Olesen, Gustavsson et al. 2012). Hence, identifying new treatment strategies targeting cognitive and negative symptoms in SZ is of crucial importance.

Cognitive symptoms in SZ are thought to be caused by dysconnectivity of the prefrontal cortex (WM) caused by white matter (WM) and myelin aberrations in this brain area. This project aims to develop new treatment strategies targeting these abnormalities.

WM and myelination abnormalities in SZ

Diffusion magnetic resonance imaging (dMRI) studies in SZ patients reveal a lower FA in frontal regions, indicating a decrease in WM integrity in this region. This is observed in medicated as well as non-medicated patients (Wang, Deng et al. 2011, Kochunov, Chiappelli et al. 2014, Mighdoll, Tao et al. 2015). Interestingly, a reduced frontal WM integrity can be observed even before SZ disease onset and advances in further stages of the disorder, spreading from frontal towards more caudal and subcortical brain regions.

An important component of WM is the sheath-like, fatty material myelin that surrounds the axons of neurons in the brain and ensures sufficient connectivity. Myelin is produced by oligodendrocytes (OLs), which are derived from oligodendrocyte precursor cells (OPCs), a type of glia cells. This process continues into adulthood (Chang, Nishiyama et al. 2000, Purves 2012).

Studies in SZ *post-mortem* brain tissue show OL as well as myelin deficits in the PFC. In this brain area, lower OL size and density alongside higher levels of OL apoptosis and necrosis have been observed, accompanied by lower levels of myelin (Uranova, Vostrikov et al. 2004, Vostrikov, Uranova et al. 2004, Vostrikov, Orlovskaya et al. 2008). Additionally, there is a regional difference in OL density in the various subdivisions of the PFC in SZ.

The anterior cingulate cortex as well as the dlPFC and mPFC show a significant reduction in the number of OLs, while the paracingulate cortex does not (Hof, Haroutunian et al. 2003, Stark, Uylings et al. 2004). In line with dMRI results, subcortical areas show OL abnormalities as well (Martins-de-Souza, Gattaz et al. 2009). In addition, proteomic analysis of temporal lobe tissue reveals significant differential expression of OL proteins and proteins involved in myelination (Martins-de-Souza, Gattaz et al. 2009). Also, myelin water fraction analysis indicates a 12% lower myelin fraction in SZ patients in the genu of the corpus callosum (close to the PFC). Furthermore, *post-mortem* immunostainings show that myelin associated glycoprotein (MAG) and 2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNP, OL-related protein) expression are significantly lower in SZ anterior frontal cortex (Flynn, Lang et al. 2003). Additionally, gene expression analysis shows differential expression of myelin-related genes in SZ dlPFC (Hakak, Walker et al. 2001). Overall, the evidence for an OL as well as a myelin deficit in the PFC of SZ *post-mortem* brain tissue is abundant. This suggests that myelination abnormalities form the basis of the WM aberrations found in imaging studies.

Importantly, the decreased FA in SZ frontal regions is directly linked to cognitive symptomatology. Correlations between cognition and frontal WM integrity have been reported in healthy individuals, and several studies have shown that these relationships are disrupted in SZ (Antonius, Prudent et al. 2011, Nazeri, Chakravarty et al. 2013, Caprihan, Jones et al. 2015). For instance, abnormalities in cognitive processing speed are associated with WM disruptions in frontal areas of chronic SZ (Roalf, Ruparel et al. 2013). Also, reduced FA is observed in the inferior fronto-occipital fasciculus in SZ, which correlates with a lower processing speed, and verbal and visual learning deficits (Liu, Lai et al. 2013, Epstein, Cullen et al. 2014). Additionally, genetic predisposition for abnormalities in the SZ-associated microRNA 137 is predictive of lower frontal-striatal FA as well as more severe attention and processing speed abnormalities in SZ (Yap, Teh et al. 2013). In first-episode SZ patients, a lower WM integrity is correlated with more severe cognitive symptoms, amongst others working memory abnormalities (Kuswanto, Teh et al. 2012, Moran, Luscher et al. 2015). Interestingly, cognitive symptomatology worsens as the disease progresses, in line with the WM alterations (Karim, Overshott et al. 2005).



The [redacted] rat model for SZ To study SZ we use the apomorphine susceptible ([redacted]) rats, their control phenotypic counterparts (apomorphine unsusceptible; [redacted]). These rats were generated by a selective breeding system in which Wistar rats with a stereotypical reaction to the dopamine agonist apomorphine (gnawing >500 times in 45 minutes in a gnawing box) were selected and bred as [redacted] rats were selected and bred based on their low response to apomorphine (gnawing <10 times per 45 minutes). The [redacted] rats are the phenotypic counterparts of the [redacted] rats in SZ-like behaviour such as the open field test, the preulse inhibition and latent inhibition tests. Currently we have the 41th generation of [redacted] and [redacted] rats. We have confirmed positive, negative as well as cognitive

symptom-like behaviours in [redacted] rats. In addition to that, the rats show similarities to SZ patients in amongst others neurobiological, endocrinological and genetic domains, and their face and construct validity as a rodent model for SZ is very high, for reviews see (Ellenbroek, Geyer et al. 1995, Ellenbroek and Cools 2000).

Myelin and OL-abnormalities in [redacted] rats

We have identified several abnormalities at the level of myelin and OL-abnormalities, and cognition in [redacted] rats that resemble the defects seen in SZ patients. The data we already collected on the myelin- and OL-related abnormalities in [redacted] versus [redacted] rats is shown in Figure 1.





[REDACTED]

Our project

Research addressing the identification and treatment of abnormalities in myelination is of the utmost importance. The fundamental knowledge produced by this research may ultimately open new avenues for a variety of new and/or improved therapeutic strategies for these and other mental disorders where myelin and cognition are affected (e.g. multiple sclerosis). Currently, we have no detailed knowledge of what causes the defects in myelination in SZ. It is also still unknown whether, and to what extent a normalization of myelination could constitute a novel therapeutic approach for cognitive symptoms of SZ. Research in this area will open the possibility to use myelination-related strategies for treatment of SZ, that have until now not been investigated.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Conclusion

Our solid fundamental neurobiological and behavioural research [has](#) strongly increased our current knowledge of the [REDACTED] rat model. In this multidisciplinary project we will build on the many observations we have made using *in vivo* rodent model systems (in particular in [REDACTED] and [REDACTED] rats), patient material, existing datasets and *in vitro* models to further refine our understanding of the role of myelination in SZ, and of the development of myelin-related therapies for cognitive symptoms of SZ. Altogether, this makes it very likely that we can achieve the aims we propose here.

Cited work (in order of appearance)

- J. Olesen, A. Gustavsson, M. Svensson, H. U. Wittchen and B. Jonsson: The economic cost of brain disorders in Europe. *Eur J Neurol*, 19(1), 155-62 (2012) doi:10.1111/j.1468-1331.2011.03590.
- Wang, W. Deng, C. Huang, M. Li, X. Ma, Y. Wang, L. Jiang, S. Lui, X. Huang, S. E. Chua, C. Cheung, G. M. McAlonan, P. C. Sham, R. M. Murray, D. A. Collier, Q. Gong and T. Li: Abnormalities in connectivity of white-matter tracts in patients with familial and non-familial schizophrenia. *Psychol Med*, 41(8), 1691-700 (2011) doi:10.1017/s0033291710002412
- P. Kochunov, J. Chiappelli, S. N. Wright, L. M. Rowland, B. Patel, S. A. Wijtenburg, K. Nugent, R. P. McMahon, W. T. Carpenter, F. Muellerklein, H. Sampath and L. E. Hong: Multimodal white matter imaging to investigate reduced fractional anisotropy and its age-related decline in schizophrenia. *Psychiatry Res*, 223(2), 148-56 (2014) doi:10.1016/j.psychres.2014.05.004 M. I. Mighdoll, R. Tao, J. E. Kleinman and T. M. Hyde: Myelin, myelin-related disorders, and psychosis. *Schizophr Res*, 161(1), 85-93 (2015) doi:10.1016/j.schres.2014.09.040
- A. Chang, A. Nishiyama, J. Peterson, J. Prineas and B. D. Trapp: NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci*, 20(17), 6404-12 (2000)
- D. Purves: Neuroscience. Sinauer Associates, Incorporated, (2012)
- N. A. Uranova, V. M. Vostrikov, D. D. Orlovskaya and V. I. Rachmanova: Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr Res*, 67(2-3), 269-75 (2004) doi:10.1016/s0920-9964(03)00181-6
- Stark, A. K., Uylings, H. B., Sanz-Arigita, E., & Pakkenberg, B. (2004). Glial cell loss in the anterior cingulate cortex, a subregion of the prefrontal cortex, in subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 161(5), 882-888
- Uranova, N. A., Vostrikov, V. M., Orlovskaya, D. D., & Rachmanova, V. I. (2004). Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr Res*, 67(2-3), 269-275. doi:10.1016/s0920-9964(03)00181-6
- Lauriat, T. L., Shiue, L., Haroutunian, V., Verbitsky, M., Ares, M., Jr., Ospina, L., & McInnes, L. A. (2008). Developmental expression profile of quaking, a candidate gene for schizophrenia, and its target genes in human prefrontal cortex and hippocampus shows regional specificity. *J Neurosci Res*, 86(4), 785-796. doi:10.1002/jnr.21534

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?

Purpose

The purpose of the project presented here is to understand and treat myelination abnormalities in SZ. More specifically, the key questions we want to address are:

1) What are the molecular, cellular, structural, functional and behavioural characteristics of WM and myelination in the [redacted] rats and their control counterparts?

2) What therapeutic strategies can normalize WM and myelin defects in the PFC and rescue cognitive behavioural abnormalities in the [redacted] rat model?

There are several reasons why we think that we will achieve the aims we set here. We are embedded in the lively scientific environment of the Donders Institute for Brain, Cognition and Behaviour. The research at the Donders Institute focuses on neuroscience at various levels, including at the organismal, behavioural, cellular, molecular, genetic, genomics and proteomics levels. The general aim of the institute is to gain insight into brain functioning in health and disease. In relation to studying (human) brain disorders, such as SZ, the Donders Institute provides core facilities for amongst others deep sequencing, transgenesis, histology, fluorescent imaging by confocal and 2-photon technology, mRNA expression profiling, rodent MRI etc. In addition, there is a central animal facility; the dedicated staff at this facility will provide the regular housing of the animals we request here. The dedicated scientists and technicians performing the rodent experiments are very well trained and experienced. In addition, both the animal models we would like to use in this project are already available in our research center, and have been very well characterized. Furthermore, our group consists of highly motivated and skilled senior scientists. We also have strong collaborations with national and international groups. Our research is regularly evaluated within our group and institute meetings and has been positively judged by many different financing organizations including EC, NWO, ZonMW, NIH and several foundations. These organizations use professional, independent external reviewers. Their positive judgments show that our research is of major scientific significance and of the highest quality. The quality of our work is further underscored by the many (inter)national prizes we received for our work and the many peer reviewed publications in the most highly respected scientific journals (e.g. Nature (n=2), Science, Cell, Neuron, Cell Reports, PNAS, J Cell Biology, J Neuroscience; see the reference list below). All these factors combined make it very likely that we, as in the past, will achieve our aims.

Reference list:

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

[Redacted content]

3.3 Relevance

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

Relevance

Scientific relevance:

This work is expected to provide novel scientific knowledge about the role of WM and myelination in SZ; (1) the multi-level characterization, (2) the identification of novel treatment strategies for cognitive symptoms of SZ will be investigated. This is of great importance as in SZ current treatment only targets positive symptoms; not negative and in particular cognitive symptoms. This represents a gap in our scientific knowledge of SZ with an urgent need to be investigated.

This fundamental knowledge might, upon proof of principle in our model system(s), ultimately facilitate the development of novel and/or improved human therapies designed to achieve a better quality of life for MD and SZ patients. Importantly, the project we present here will allow us to look at new strategies to enhance myelination. Myelination defects are found in many other diseases like multiple sclerosis, autism, Parkinson's disease and Alzheimer. The treatment strategies we will develop in this project will therefore be renewing not only in the fields of MD and SZ research but can also benefit other research areas.

In addition, we will investigate the relationship between WM and myelin alterations and behaviour. Research in this area is evolving, and knowledge about the influence of myelination on behaviour is limited. Therefore our findings could be of major influence in this field.

Moreover, the research described in this application is funded by a Top Talent grant provided by the Donders Institute for Brain Cognition and Behaviour. This indicates the novelty, potential and feasibility of the project.

Societal relevance:


Brain disorders are associated with substantial burden for the patients and enormous costs for society. Indeed, the economic cost of diseases is becoming an increasingly important parameter for health and research policies. Research leads to discovery of mechanisms that are of equal importance to neuropsychiatric and neurological disorders (Olesen, Baker et al. 2006). World Health Organization (WHO) data indicate that, together, these disorders account for one-third of the burden of all diseases in the wealthy part of the world (Olesen and Leonardi 2003). The total annual cost figure of brain disorders, 798 billion Euros, makes it apparent that these disorders are the biggest health challenge of the century, posing a serious threat to our social and health care systems as well as to the future of European economy (Olesen, Gustavsson et al. 2012). Furthermore, the prevalence and cost of brain disorders are going to increase because of increasing life expectancy. In particular, the number of patients with neuropsychiatric disorders will increase. Increased focus on research strategies, prevention, and care is therefore necessary to reduce the future cost of brain disorders. Animal models of neuropsychiatric disorders are essential for the assessment of new therapeutic options. Here we focus on mechanisms and therapeutics regarding myelination abnormalities in SZ, on the one hand because of their associated burden for the patient and society, and on the other hand because of our research track record and funding.

We would also like to highlight the fact that the disorder we will investigate in this project, SZ, has insufficient treatment. This causes the disease burden for patients and their families to be very high. In SZ current treatment only targets positive, and not negative and cognitive symptoms (see above). It is therefore of the utmost importance that research concerning better and more effective treatment strategies is conducted, and this is of both high scientific and societal relevance. Our investigation will look at highly novel treatment strategies and therefore has the potential to, ultimately, enhance the treatment possibilities for SZ patients.

3.4 Research Strategy

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

Research strategy

Our research strategy is 

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Cited work (in order of appearance)

- J. R. Gregg, N. R. Herring, A. V. Naydenov, R. P. Hanlin and C. Konradi: Downregulation of oligodendrocyte transcripts is associated with impaired prefrontal cortex function in rats. *Schizophr Res*, 113(2-3), 277-87 (2009) doi:10.1016/j.schres.2009.05.023
- P. Franke, W. Maier, C. Hain and T. Klingler: Wisconsin Card Sorting Test: an indicator of vulnerability to schizophrenia? *Schizophr Res*, 6(3), 243-9 (1992)
- M. Frascarelli, S. Tognin, A. Mirigliani, F. Parente, A. Buzzanca, M. C. Torti, E. Tinelli, F. Caramia, F. Di Fabio, M. Biondi and P. Fusar-Poli: Medial frontal gyrus alterations in schizophrenia: relationship with duration of illness and executive dysfunction. *Psychiatry Res*, 231(2), 103-10 (2015) doi:10.1016/j.psychresns.2014.10.017
- F. Carletti, J. B. Woolley, S. Bhattacharyya, R. Perez-Iglesias, P. Fusar Poli, L. Valmaggia, M. R. Broome, E. Bramon, L. Johns, V. Giampietro, S. C. Williams, G. J. Barker and P. K. McGuire: Alterations in white matter evident before the onset of psychosis. *Schizophr Bull*, 38(6), 1170-9 (2012) doi:10.1093/schbul/sbs053
- N. C. Andreasen, P. Nopoulos, V. Magnotta, R. Pierson, S. Ziebell and B. C. Ho: Progressive brain change in schizophrenia: a prospective longitudinal study of first-episode schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 70(7), 672-9 (2011) doi:10.1016/j.biopsych.2011.05.017
- J. I. Friedman, C. Tang, D. Carpenter, M. Buchsbaum, J. Schmeidler, L. Flanagan, S. Golembo, I. Kanellopoulou, J. Ng, P. R. Hof, P. D. Harvey, N. D. Tsopelas, D. Stewart and K. L. Davis: Diffusion tensor imaging findings in first-episode and chronic schizophrenia patients. *Am J Psychiatry*, 165(8), 1024-32 (2008) doi:10.1176/appi.ajp.2008.07101640
- L. Yao, S. Lui, Y. Liao, M. Y. Du, N. Hu, J. A. Thomas and Q. Y. Gong: White matter deficits in first episode schizophrenia: an activation likelihood estimation meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 45, 100-6 (2013) doi:10.1016/j.pnpbp.2013.04.019

- T. S. Eich, D. E. Nee, C. Insel, C. Malapani and E. E. Smith: Neural correlates of impaired cognitive control over working memory in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 76(2), 146-53 (2014) doi:10.1016/j.biopsych.2013.09.032
- N. A. Hubbard, J. L. Hutchison, D. Z. Hambrick and B. Rypma: The enduring effects of depressive thoughts on working memory. *J Affect Disord*, 190, 208-213 (2015) doi:10.1016/j.jad.2015.06.056
- .Najm FJ, Madhavan M, Zaremba A, Shick E, Karl RT, Factor DC, Miller TE, Nevin ZS, Kantor C, Sargent A, Quick KL, Schlatzer DM, Tang H, Papoian R, Brimacombe KR, Shen M, Boxer MB, Jadhav A, Robinson AP, Podojil JR, Miller SD, Miller RH, Tesar PJ. Drug-based modulation of endogenous stem cells promotes functional remyelination in vivo *Nature*. 2015 Jun 11;522(7555):216-20. doi: 10.1038/nature14335. Epub 2015 Apr 20.
- Li Z, He Y, Fan S, Sun B. Clemastine rescues behavioral changes and enhances remyelination in the cuprizone mouse model of demyelination. *Neurosci Bull*. 2015 Oct;31(5):617-25. doi: 10.1007/s12264-015-1555-3. Epub 2015 Aug 6.
- Deshmukh VA, Tardif V, Lyssiotis CA, Green CC, Kerman B, Kim HJ, Padmanabhan K, Swoboda JG, Ahmad I, Kondo T, Gage FH, Theofilopoulos AN, Lawson BR, Schultz PG, Lairson LL. A regenerative approach to the treatment of multiple sclerosis. *Nature*. 2013 Oct 17;502(7471):327-32. doi: 10.1038/nature12647. Epub 2013 Oct 9
- Huang JK, Jarjour AA, Nait Oumesmar B, Kerninon C, Williams A, Krezel W, Kagechika H, Bauer J, Zhao C, Baron-Van Evercooren A, Chambon P, Ffrench-Constant C, Franklin RJ. Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination. *Nat Neurosci*. 2011 Jan;14(1):45-53. doi: 10.1038/nn.2702. Epub 2010 Dec 5.
- Monin A, Baumann PS, Griffa A, Xin L, Mekle R, Fournier M, Buttica C, Klaey M, Cabungcal JH, Steullet P, Ferrari C, Cuenod M, Gruetter R, Thiran JP, Hagmann P, Conus P, Do KQ. Glutathione deficit impairs myelin maturation: relevance for white matter integrity in schizophrenia patients. *Mol Psychiatry*. 2015 Jul;20(7):827-38. doi: 10.1038/mp.2014.88. Epub 2014 Aug 26.
- Choy KH1, Dean O, Berk M, Bush AI, van den Buuse M. Effects of N-acetyl-cysteine treatment on glutathione depletion and a short-term spatial memory deficit in 2-cyclohexene-1-one-treated rats. *Eur J Pharmacol*. 2010 Dec 15;649(1-3):224-8. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.09.035. Epub 2010 Sep 22.
- Kessler A, Biasibetti M, Feksa LR, Rech VC, Melo DA, Wajner M, Dutra-Filho CS, Wyse AT, Wannmacher CM. Effects of cysteamine on oxidative status in cerebral cortex of rats. *Metab Brain Dis*. 2008 Mar;23(1):81-93. Epub 2007 Nov 21.
- Pae CU1, Lee C, Paik IH. Therapeutic possibilities of cysteamine in the treatment of schizophrenia. *Med Hypotheses*. 2007;69(1):199-202. Epub 2006 Dec 12.
- D. Purves: Neuroscience. Sinauer Associates, Incorporated, (2012)
- A. Chang, A. Nishiyama, J. Peterson, J. Prineas and B. D. Trapp: NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci*, 20(17), 6404-12 (2000)
- L. E. Rivers, K. M. Young, M. Rizzi, F. Jamen, K. Psachoulia, A. Wade, N. Kessaris and W. D. Richardson: PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci*, 11(12), 1392-401 (2008) doi:10.1038/nn.2220
- S. L. Bengtsson, Z. Nagy, S. Skare, L. Forsman, H. Forsberg and F. Ullén: Extensive piano practicing has regionally specific effects on white matter development. *Nat Neurosci*, 8(9), 1148-50 (2005) doi:10.1038/nn1516
- S. Mensch, M. Baraban, R. Almeida, T. Czopka, J. Ausborn, A. El Manira and D. A. Lyons: Synaptic vesicle release regulates myelin sheath number of individual oligodendrocytes in vivo. *Nat Neurosci* (2015) doi:10.1038/nn.3991
- E. M. Gibson, D. Purger, C. W. Mount, A. K. Goldstein, G. L. Lin, L. S. Wood, I. Inema, S. E. Miller, G. Bieri, J. B. Zuchero, B. A. Barres, P. J.

Woo, H. Vogel and M. Monje: Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science*, 344(6183), 1252304 (2014) doi:10.1126/science.1252304

- J. Liu, K. Dietz, J. M. DeLoyht, X. Pedre, D. Kelkar, J. Kaur, V. Vialou, M. K. Lobo, D. M. Dietz, E. J. Nestler, J. Dupree and P. Casaccia: Impaired adult myelination in the prefrontal cortex of socially isolated mice. *Nat Neurosci*, 15(12), 1621-3 (2012) doi:10.1038/nn.3263
- M. Makinodan, K. M. Rosen, S. Ito and G. Corfas: A Critical Period for Social Experience-Dependent Oligodendrocyte Maturation and Myelination. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6100), 1357-1360 (2012) doi:10.1126/science.1220845
- Tomlinson L, Leiton CV, Colognato H. Behavioral experiences as drivers of oligodendrocyte lineage dynamics and myelin plasticity. *Neuropharmacology*. 2015 Sep 28. pii: S0028-3908(15)30108-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.09.016.

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]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

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

Coherence

All experiments requested in this application are centred around a common topic: WM and myelin abnormalities in SZ. The relationship between WM, myelination and disease-related behaviours is largely unknown. An attractive part of our research constitutes the combination of the various characterization approaches in Level 1. We will be able to elucidate the specific myelination deficits at different states, with the combination of

molecular and cellular techniques. Furthermore, we will be able to link these cellular/molecular results to the WM structure observed with MRI. This makes the research approach not only very strong, but also more easily translatable to the human situation. There is a substantial amount of literature about WM structure in the brains of SZ patients, and by applying the same imaging approach in our rat model we will be able not only to compare the results, but also to combine these results with molecular and cellular data. In addition, in MD and SZ patients MRI experiments are often combined with cognitive tests to see the correlation between brain structure and activation and cognitive performance. With the project presented here we will be able to apply the same approach in our rat models, and to elaborate on the changes in WM structure by looking closely at myelination at the molecular and cellular levels. This way we will elucidate exactly the relationship between disease-related behaviours, WM and myelination.

Level 2: manipulation adds another dimension to this project. We will be able to investigate pharmacological as well as cognitive behavioural approaches for the treatment of WM and myelination abnormalities and their related disease-specific behaviours. This greatly increases the relevance of the project, because ultimately it could lead to new treatment strategies, and as such increase the quality of life for SZ patients.

The animal model we will use is well suited for this particular project. The [redacted] and [redacted] rats are a unique rat model for SZ. Unlike other animal models, these rats show a high face as well as construct validity for all symptom categories of SZ, as previously described (Ellenbroek, Geyer et al. 1995, Ellenbroek and Cools 2000). [redacted]

[redacted] In addition, the rats show similarities with SZ patients in amongst others neurobiological, endocrinological and genetic domains; for reviews see (Ellenbroek, Geyer et al. 1995, Ellenbroek and Cools 2000). [redacted]

[redacted] Hence, this rat model for SZ is ideal for this project concerning WM and myelination abnormalities in SZ.

Cited work

- B. A. Ellenbroek, M. A. Geyer and A. R. Cools: The behavior of [redacted] rats in animal models with construct validity for schizophrenia. *J Neurosci*, 15(11), 7604-11 (1995)
- B. Ellenbroek and A. Cools: Animal models for the negative symptoms of schizophrenia. *Behavioural pharmacology*, 11(3/4), 223-234 (2000)

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 | Characterization: Molecular / Cellular / Structural |
| 2 | Characterization: Behaviour |
| 3 | Pharmacological manipulation |
| 4 | Behavioural manipulation |

**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'. | 10300 | | | | |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------------------|---|-----------------------------------------------------|
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen | | | | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | <table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="616 798 795 821">Serial number</th> <th data-bbox="1355 798 2083 821">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="616 829 795 952">1</td> <td data-bbox="1355 829 2083 952">Characterization: Molecular / Cellular / Structural</td> </tr> </tbody> </table> | Serial number | Type of animal procedure | 1 | Characterization: Molecular / Cellular / Structural |
| Serial number | Type of animal procedure | | | | | |
| 1 | Characterization: Molecular / Cellular / Structural | | | | | |

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.

1. Experimental approach and primary outcome parameters

The experimental approach will consist of the decapitation of animals without anaesthesia, or by perfusion of animals with 1-4% PFA or 1-4% PFA with 0.5-2% GA under anaesthesia. Afterwards, brains will be removed immediately and frozen on dry ice (-80°C)/isopentane (-60°C) or placed in 1-4% PFA/GA at 4°C.

We will study several primary outcome parameters that, combined, allow us to characterize myelination:

- lipidomic state

- [REDACTED] (a project in collaboration with prof. [REDACTED])

- [REDACTED]

- [REDACTED]

- [REDACTED]

- [REDACTED] (a collaboration with [REDACTED])

- [REDACTED]

- [REDACTED]

- [REDACTED]

- [REDACTED]

- [REDACTED]

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

2. Animal procedures

Animal procedures will consist of direct decapitation without anaesthesia, or of intracardiac perfusion with 1-4% PFA or 1-4% PFA with 0.5-2% GA under terminal anaesthesia (overdose pentobarbital, i.p.). Decapitation without anaesthesia is necessary for the gene, protein, metabolomics and lipidomics studies, given that anaesthesia has been shown to affect these measurements. Killing using perfusion is necessary for the brains to retain an optimal tissue structure, for characterization by immunohistochemistry, electron microscopy MRI or third harmonics generation imaging.

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

3. Statistical methods

The proposed control groups of [redacted] rats are necessary; data cannot be appropriately interpreted without knowledge about baseline myelination characteristics.

Group sizes will be determined using a power analysis. Based on our previous work and experience we estimate group sizes at 15 per genotype for most of the experiments.

For the [redacted] experiments we will use n=15. A high number of animals is required because the data collected in [redacted] experiments consists of the expression level of [redacted] in the tissue. To find subtle differences in the expression of a specific [redacted] and to be able to apply multiple comparisons corrections we will need a high n. In the past our group has successfully performed [redacted] experiments with an n of 10. Therefore we will use n=10 for the [redacted]. For the electron microscopy the n=6 will be applied and for the electrophysiology experiments we will use n=6/group as described before [redacted]. For [redacted] imaging group sizes of n=13-18 have been applied with success in our group and hence we ask for n=15/group for these experiments [redacted]).

Cited work

- Luoni, A., Hulsken, S., Cazzaniga, G., Racagni, G., Homberg, J. R., & Riva, M. A. (2013). Behavioural and neuroplastic properties of chronic lurasidone treatment in serotonin transporter knockout rats. *Int J Neuropsychopharmacol*, 16(6), 1319-1330. doi:10.1017/s1461145712001332
- van der Marel, K., Bouet, V., Meerhoff, G. F., Freret, T., Boulouard, M., Dauphin, F., . . . Reneman, L. (2015). Effects of long-term methylphenidate treatment in adolescent and adult rats on hippocampal shape, functional connectivity and adult neurogenesis. *Neuroscience*, 309, 243-258. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.04.044
- Selten, M. M., Meyer, F., Ba, W., Valles, A., Maas, D. A., Negwer, M., . . . Martens, G. J. (2016). Increased GABAB receptor signaling in a rat model for schizophrenia. *Sci Rep*, 6, 34240. doi:10.1038/srep34240
- van der Marel, K., Homberg, J. R., Otte, W. M., & Dijkhuizen, R. M. (2013). Functional and Structural Neural Network Characterization of Serotonin Transporter Knockout Rats. *PLoS One*, 8(2), e57780. doi:10.1371/journal.pone.0057780

B. The animals

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

1. Choice and justification animals

We use the apomorphine-susceptible ([redacted]) rats and their controls ([redacted]) to model SZ-like characteristics. [redacted] rat lines are bred by our group at the Nijmegen Central Animal Facility.

Importantly, there is a lack of insight into sex differences in mechanisms underlying SZ (Kelly et al., 2016, Crawford et al., 2016, Seney et al., 2014). Hence, the inclusion of male and female rats will provide new insight into sex differences in mechanisms involved in schizophrenia-related pathology. The components we are investigating are cognition and myelination. It is known that cognitive symptoms are more severe in male than in female SZ patients (Kao et al., 2013; Leger & Neill, 2016). Therefore mixing of sexes in one group will diminish our chances of finding relevant differences in cognition. In addition there is a sex difference in mRNA expression in the PFC of SZ patients (Qin et al., 2016). In animal models of SZ differences in the number of myelinated axons have been found between male and female rats and the level of demyelination in a demyelination model is different between the sexes (Valeiras et al., 2014; Wischhof et al., 2015). [redacted]

[REDACTED]. Hence, mixing the sexes in one group while looking at myelin and oligodendrocytes could lead to a smaller change of identifying relevant differences. Therefore we will only include male rats in our experiments.

Figure 2. [REDACTED]



Naive rats in three age groups will be studied: childhood, adolescence, adulthood. This serves the purpose of looking at the development of WM and myelination within all critical periods in the development of SZ. [REDACTED] outcome parameter is the exception, for this technique only **rats of 1-2 days old** are needed.

So we will use 15 rats per genotype, for 2 genotypes ([REDACTED]), 1 sex, 2 outcome measures ([REDACTED]), and 3 life stages: $15 \times 2 \times 1 \times 2 \times 3 = 180$ rats are needed.

So we will use 10 rats per genotype, for 2 genotypes ([REDACTED]), 1 sex, 2 outcome measures ([REDACTED]), and 3 life stages: $10 \times 2 \times 1 \times 2 \times 3 = 120$ rats are needed.

So we will use 6 rats per genotype, for 2 genotypes ([REDACTED]), 1 sex, 2 outcome measures ([REDACTED]), and 3 life stages: $6 \times 2 \times 1 \times 3 \times 3 = 108$ rats are needed.

For [REDACTED] we will need 15 rats per genotype, for 2 genotypes ([REDACTED]), 1 sex, 1 outcome measure, and 1 life stage: $15 \times 2 \times 1 \times 1 \times 1 = 30$ rats are needed.

Unfortunately, it is not possible to combine multiple outcome measures within 1 animal, because every one of these analyses needs a different way of processing of the brain tissue, that are not compatible with each other. In addition, the mPFC area that is affected in [REDACTED] rats is a very small brain area. When the brain is bisected into two hemispheres this area gets cut in half. The remaining tissue on both sides is slightly different because

the cut is never exactly in the middle of the brain, in addition there is not enough tissue left to extract for example RNA from. [REDACTED]

Cited work (in order of appearance)

- D. L. Kelly, L. M. Rowland, K. M. Patchan, K. Sullivan, A. Earl, H. Raley, F. Liu, S. Feldman and R. P. McMahon: Schizophrenia clinical symptom differences in women vs. men with and without a history of childhood physical abuse. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health*, 10, 5 (2016) doi:10.1186/s13034-016-0092-9
- M. B. Crawford and L. E. DeLisi: Issues related to sex differences in antipsychotic treatment. *Curr Opin Psychiatry* (2016) doi:10.1097/ycp.0000000000000243
- M. L. Seney and E. Sibille: Sex differences in mood disorders: perspectives from humans and rodent models. *Biol Sex Differ*, 5(1), 17 (2014) doi:10.1186/s13293-014-0017-3
- Kao, Y. C., Liu, Y. P., Lien, Y. J., Lin, S. J., Lu, C. W., Wang, T. S., & Loh, C. H. (2013). The influence of sex on cognitive insight and neurocognitive functioning in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 44, 193-200. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.02.006
- Leger, M., & Neill, J. C. (2016). A systematic review comparing sex differences in cognitive function in schizophrenia and in rodent models for schizophrenia, implications for improved therapeutic strategies. *Neurosci Biobehav Rev*, 68, 979-1000.
- Qin, W., Liu, C., Sodhi, M., & Lu, H. (2016). Meta-analysis of sex differences in gene expression in schizophrenia. *BMC Syst Biol*, 10 Suppl 1, 9. doi:10.1186/s12918-015-0250-3
- Valeiras, B., Rosato Siri, M. V., Codagnone, M., Reines, A., & Pasquini, J. M. (2014). Gender influence on schizophrenia-relevant abnormalities in a cuprizone demyelination model. *Glia*, 62(10), 1629-1644. doi:10.1002/glia.22704
- Wischhof, L., Irrsack, E., Osorio, C., & Koch, M. (2015). Prenatal LPS-exposure--a neurodevelopmental rat model of schizophrenia-- differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 57, 17-30. doi:10.1016/j.pnpbp.2014.10.004

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|----------------|--------------|---------------------------|-------------|
| Rat [REDACTED] | Own breeding | 68 | Childhood |
| Rat [REDACTED] | Own breeding | 68 | Adolescence |
| Rat [REDACTED] | Own breeding | 68 | Adulthood |
| Rat [REDACTED] | Own breeding | 68 | Childhood |
| Rat [REDACTED] | Own breeding | 68 | Adolescence |
| Rat [REDACTED] | Own breeding | 68 | Adulthood |
| Rat [REDACTED] | Own breeding | 15 | Embryonal |
| Rat [REDACTED] | Own breeding | 15 | Embryonal |

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.

C. Re-use

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 rat is the best nonprimate animal model to study human psychiatric disorders. Because of the biological as well as phenotypic complexity of these disorders, it is impossible to use lower-order animals or organs. In addition, specific brain mechanisms, such as myelination, cannot be studied in vivo in humans, because of ethical restraints. The use of cell models, or other alternatives without the use of animals, is not an option because the myelin abnormalities in SZ are very complex, and hence need to be studied in the context of the brain.

Reduction: A reduction in the number of animals per group would reduce statistical power needed to demonstrate effects on neurobiological mechanisms. We choose our outcome parameters specifically to look at myelination, we did not include any outcome measures that are not absolutely necessary to draw a solid conclusion considering the myelination state of the rats. In addition we did an elaborate literature review to make sure we are aware of experiments that have already been done and we only ask for experiments here that are relevant to our research field. Also, we thought about combining several outcome parameters within the same animals although unfortunately this is not possible within the experiments described here.

Refinement: The analyses we propose here cannot be performed without sacrificing animals. As usual, all efforts will be undertaken to minimize animal suffering during sacrificing. Only experienced researchers will sacrifice the animals and the procedures are done as fast as possible to minimize stress for the animals.

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

2. Measures to minimise adverse effects

To minimize adverse effects during the sacrifice of the animals, only experienced researchers will perform the procedures. The procedures will be performed in a separate room as fast as possible such that the rats do not experience unnecessary stress and will not suffer. In addition, rats will be socially housed with cage enrichment.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The only adverse effect on the welfare of the animals will be the killing. For the [REDACTED] and [REDACTED] rats the breeding also involves a mild discomfort as animals are weaned at PND28 instead of the usual PND21. This mild discomfort is because the pups are getting heavier, and hence have less space in the cage.

Explain why these effects may emerge.

Because the decapitation without anaesthesia will be done by an experienced experimenter and will take place in a fraction of a second, no pain or adverse effects are expected from the decapitation. Before perfusion, anaesthesia will be used and this procedure will also be conducted by an experienced researcher to minimize discomfort. The [REDACTED] rat model itself includes a mild discomfort because of weaning at PND28.

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

Because the decapitation without anaesthesia will be done by an experienced experimenter and will take place in a fraction of a second, no pain or adverse effects are expected from the decapitation. Before perfusion, anaesthesia will be used and this procedure will also be conducted by an experienced researcher to minimize discomfort. The [REDACTED] rat model itself includes a mild discomfort because of weaning at PND28.

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).

All animals will experience mild discomfort levels during the experiment. The breeding of [REDACTED] and [REDACTED] animals is classified as mild discomfort as well.

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.

We need the brains of the rats to assess WM and myelination abnormalities.

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'. | 10300 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen | |
| 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 Characterization: Behaviour |

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

1. Experimental approach and primary outcome parameters

Animals will be subjected to several behavioural tests. After the experiment ends rats are sacrificed by decapitation without anaesthesia or by perfusion with 1-4% PFA with or without 0.5-2% GA under anaesthesia.

Cognitive behavioural characterization:

Behavioural characterization will be performed in 2 groups of animals with the following tests for cognition and affection:

- Group 1.1: [REDACTED]

- Group 1.2: [REDACTED]

Behavioural characterization of cognitive phenotypes in [REDACTED] rats. [REDACTED]
[REDACTED] Therefore we would like to perform behavioural tests that rely on mPFC functioning as well as tests that represent a cognitive defect seen in SZ patients. [REDACTED]

All of these tests represent cognitive behaviour in humans that is aberrant in SZ, and therefore they are relevant to perform in our animal model and its controls. Different behavioural tests are combined within one animal as much as possible. Unfortunately, behaviour in the [REDACTED] test can be influenced by previous experience of the rats, therefore we have to perform it in a separate group of animals.

Outcome measures:

[Redacted text block]

[Redacted text block]

5. Reversal learning: right light + left lever is rewarded



Cited work (in order of appearance)

- J. R. Gregg, N. R. Herring, A. V. Naydenov, R. P. Hanlin and C. Konradi: Downregulation of oligodendrocyte transcripts is associated with impaired prefrontal cortex function in rats. *Schizophr Res*, 113(2-3), 277-87 (2009) doi:10.1016/j.schres.2009.05.023
- P. Franke, W. Maier, C. Hain and T. Klingler: Wisconsin Card Sorting Test: an indicator of vulnerability to schizophrenia? *Schizophr Res*, 6(3), 243-9 (1992)
- M. Frascarelli, S. Tognin, A. Mirigliani, F. Parente, A. Buzzanca, M. C. Torti, E. Tinelli, F. Caramia, F. Di Fabio, M. Biondi and P. Fusar-Poli: Medial frontal gyrus alterations in schizophrenia: relationship with duration of illness and executive dysfunction. *Psychiatry Res*, 231(2), 103-10 (2015) doi:10.1016/j.psychres.2014.10.017
- F. Carletti, J. B. Woolley, S. Bhattacharyya, R. Perez-Iglesias, P. Fusar Poli, L. Valmaggia, M. R. Broome, E. Bramon, L. Johns, V. Giampietro, S. C. Williams, G. J. Barker and P. K. McGuire: Alterations in white matter evident before the onset of psychosis. *Schizophr Bull*, 38(6), 1170-9 (2012) doi:10.1093/schbul/sbs053
- N. C. Andreasen, P. Nopoulos, V. Magnotta, R. Pierson, S. Ziebell and B. C. Ho: Progressive brain change in schizophrenia: a prospective longitudinal study of first-episode schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 70(7), 672-9 (2011) doi:10.1016/j.biopsych.2011.05.017
- J. I. Friedman, C. Tang, D. Carpenter, M. Buchsbaum, J. Schmeidler, L. Flanagan, S. Golembo, I. Kanellopoulou, J. Ng, P. R. Hof, P. D. Harvey, N. D. Tsopelas, D. Stewart and K. L. Davis: Diffusion tensor imaging findings in first-episode and chronic schizophrenia patients. *Am J Psychiatry*, 165(8), 1024-32 (2008) doi:10.1176/appi.ajp.2008.07101640
- L. Yao, S. Lui, Y. Liao, M. Y. Du, N. Hu, J. A. Thomas and Q. Y. Gong: White matter deficits in first episode schizophrenia: an activation likelihood estimation meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 45, 100-6 (2013) doi:10.1016/j.pnpbp.2013.04.019
- T. S. Eich, D. E. Nee, C. Insel, C. Malapani and E. E. Smith: Neural correlates of impaired cognitive control over working memory in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 76(2), 146-53 (2014) doi:10.1016/j.biopsych.2013.09.032 N. A. Hubbard, J. L. Hutchison, D. Z. Hambrick and B. Rypma: The enduring effects of depressive thoughts on working memory. *J Affect Disord*, 190, 208-213 (2015) doi:10.1016/j.jad.2015.06.056
- Phillips AG, Ahn S, Floresco SB. Magnitude of dopamine release in medial prefrontal cortex predicts accuracy of memory on a delayed response task. *J Neurosci*. 2004 Jan 14;24(2):547-53.

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

2. Animal procedures

Animals will be subjected to several behavioural tests. After the last behavioural experiment ends rats are sacrificed by decapitation without anaesthesia or by perfusion with 1-4% PFA with or without 0.5-2% GA under anaesthesia.

Duration is as follows:

Group 1: Behavioural characterization

[REDACTED]

- Group 1.2: Set-shifting (2 hours per day for 6 weeks)

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

3. Statistical methods

Data are analysed by two-way ANOVA's. Group sizes will be determined using a power analysis. Based on our previous work and experience we estimate group sizes at 15 per genotype. We have minimized the number of groups by using one group of animals for multiple behavioural tests. However, the effect of performing [REDACTED] on the performance in the [REDACTED] is unknown, therefore we will also do this test in a separate group of animals. In addition, because the [REDACTED] test is a relatively long paradigm, behaviour of the rats in other tests could be influenced by the training they received in the [REDACTED] test. Therefore we need two separate groups of rats to do these test.

B. The animals

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

1. Choice and justification of animals

We use the apomorphine-susceptible [REDACTED] rats and their appropriate controls [REDACTED] to model SZ-like characteristics. The [REDACTED] rat lines [REDACTED]

Importantly, there is a lack of insight into sex differences in mechanisms underlying SZ (Kelly et al., 2016, Crawford et al., 2016, Seney et al., 2014). We cannot mix the sexes in one group, as sex differences have been reported in the behavioural measures we apply (Granger et al., 2016,

Grandhi et al., 2016, Evans et al., 2015).

Behavioural characterization will be performed in adulthood (PND60 onwards). So for behavioural characterization we will need: 15 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 4 experimental groups (2 activity control groups;) 1 life stage: $15 \times 2 \times 1 \times 4 \times 1 = 120$ rats.

The activity control groups are necessary because the activity the rats undergo in the tests could have an impact on the brain. After the behavioural testing we want to look at the myelin characteristics to be able to correlate them to the behaviour of the rats. To do this in a correct manner we will need to control for activity.

Cited work (in order of appearance)

- D. L. Kelly, L. M. Rowland, K. M. Patchan, K. Sullivan, A. Earl, H. Raley, F. Liu, S. Feldman and R. P. McMahon: Schizophrenia clinical symptom differences in women vs. men with and without a history of childhood physical abuse. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health*, 10, 5 (2016) doi:10.1186/s13034-016-0092-9
- M. B. Crawford and L. E. DeLisi: Issues related to sex differences in antipsychotic treatment. *Curr Opin Psychiatry* (2016) doi:10.1097/ycp.0000000000000243
- M. L. Seney and E. Sibille: Sex differences in mood disorders: perspectives from humans and rodent models. *Biol Sex Differ*, 5(1), 17 (2014) doi:10.1186/s13293-014-0017-3
- M. W. Granger, B. Franko, M. W. Taylor, C. Messier, P. S. George-Hyslop and S. A. Bennett: A TgCRND8 Mouse Model of Alzheimer's Disease Exhibits Sexual Dimorphisms in Behavioral Indices of Cognitive Reserve. *J Alzheimers Dis* (2016) doi:10.3233/jad-150587
- R. V. Grandhi, K. Gourishetti, A. Kishore and K. Nandakumar: Assessment of female rats for studying episodic memory and its deficit associated with doxorubicin-induced chemobrain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2016) doi:10.1111/1440-1681.12568
- K. L. Evans and E. Hampson: Sex-dependent effects on tasks assessing reinforcement learning and interference inhibition. *Front Psychol*, 6, 1044 (2015) doi:10.3389/fpsyg.2015.01044

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---------|--------------|---------------------------|------------|
| Rat | Own breeding | 60 | adulthood |
| Rat | Own breeding | 60 | adulthood |

C. Re-use

Will the animals be re-used?

C. Re-use

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 rat is the best animal model to study human psychiatric disorders. Because of the complexity of these disorders biologically as well as phenotypically, it is impossible to use lower-order animals or organs. In addition, specific brain mechanisms, such as myelination, cannot be studied *in vivo* in humans, because of ethical restraints.

Reduction: A reduction in the number of animals per group would reduce statistical power needed to demonstrate effects. Importantly, we reduced the number of animals by using one group of animals to characterize behaviour in multiple tests. In addition we did an elaborate literature review to make sure we are aware of experiments that have already been done and we only ask for experiments here that are relevant to our research field.

Refinement: To measure SZ-related symptoms the rats have to be exposed to behavioural tests that might be stressful. This is necessary and cannot be avoided. The analyses we propose here cannot be performed without sacrificing animals. As usual, all efforts will be undertaken to minimize animal suffering during all procedures and the sacrifice. Only experienced researchers will work with the animals and the procedures are done as fast as possible to minimize stress for the animals.

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

2. Measures to minimise adverse effects

To minimize adverse effects during the behavioural tests and the sacrifice of the animals, only experienced researchers will perform the procedures. The sacrifice will be performed in a separate room as fast as possible such that the rats do not experience unnecessary stress and will not suffer. In addition, rats will be socially housed with cage enrichment. During experiments the rats will be handled by experienced researchers to minimize stress and the rats' wellbeing will be checked daily.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

n.a.

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?

The rats experience psychological stress in the behavioural tests, but this is not associated with physical pain or damage. For the [REDACTED] and [REDACTED] rats the breeding also involves a mild discomfort as animals are weaned at PND28 instead of the usual PND21. This mild discomfort is because the pups are getting heavier, and hence have less space in the cage.

Explain why these effects may emerge.

Rats are exposed to novel test cages, which may cause stress. This stress is about equal to cage cleaning. Finally, since rats like sucrose a lot, this will be used as reward in the tests that require a food reward; delayed alternation, radial arm maze and set-shifting tests are expected to be a pleasurable activity for the animals for this reason.

The tests are stressful, but at the psychological level, not at the level of pain. Therefore, no pain killers will be used.

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

To minimize adverse effects during all procedures only experienced researchers will perform them. The sacrifice will be performed in a separate room as fast as possible so the rats do not experience unnecessary stress and will not suffer. In addition to that, rats are socially housed and have cage enrichment.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

General humane endpoints will apply: Piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor coat conditions, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, red fur, elephants teeth.

Indicate the likely incidence.

Based on our experience the incidence of a humane endpoint in the procedures as they are described here is very low, <2%.

K. Classification of severity of procedures

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

During behavioural testing rats will experience mild stress. The breeding of [REDACTED] and [REDACTED] animals is classified as mild discomfort as well.

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.

Brains of the rats will be studied.

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'. | 10300 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen | |
| 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 Pharmacological manipulation |

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.

1. Experimental approach and primary outcome parameters

[REDACTED]. After the experiment ends rats are sacrificed by decapitation without anaesthesia or by perfusion with 1-4% PFA (with or without 0.5-2% GA) under anaesthesia. Choice of sacrificing depends on whether level 1 experiments reveal molecular or cellular readouts to be the most reliable to judge the effect of the treatment on myelination.

Group 1: Pharmacological manipulation

Application of pharmacological compound followed by behavioural or molecular/cellular/structural characterization.

- Group 1.1: Application of pharmacological compound; molecular/cellular characterization
- Group 1.2: Application of vehicle; molecular/cellular characterization

In group 1.1 and 1.2 we will choose the molecular outcome parameter of DAP1 which shows the largest differences between [REDACTED] and [REDACTED]. This way we can reduce the number of animals significantly. We could of course propose to do the pharmacological manipulation followed by all the outcome parameters at the molecular/cellular/structural/functional levels that we will measure in DAP1. However, showing the effects of a pharmacological compound in 1 reliably different outcome measure should be enough to gain convincing results on the effectiveness of a drug to treat myelin abnormalities.

GO/NO GO point: If in group 1.1 and 1.2 the pharmacological treatment is effective, groups 1.3-1.6 will be added. Otherwise, we will terminate the experiments of this DAP.

We will perform a dose-response pilot experiment to ensure successful drug testing in the rats. In these pilot studies up to 3 different doses of the drug will be tested in small groups of animals (n=6/group).

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

Unfortunately, it is not possible to combine the several vehicle groups. To ensure a reliable control group rats of the vehicle groups will have to be treated and sacrificed at the same time and in the same environment as the rats receiving the pharmacological treatment. It is unrealistic to propose to do more than two groups of rats at the same time considering timelines and workload, therefore we propose the proper vehicle group for every pharmacologically treated group.

We would like to test [REDACTED] Until this day optimal doses of these drugs to target myelination in the rat are unknown, therefore doing these dose-response curves will be necessary. However, if in the mean time literature emerges that shows effectiveness of one of the drugs on myelination level in the rat we will adapt the dose used there and skip the pilot experiment to reduce the number of animals used.

Outcome measures:

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]



- N. C. Andreasen, P. Nopoulos, V. Magnotta, R. Pierson, S. Ziebell and B. C. Ho: Progressive brain change in schizophrenia: a prospective longitudinal study of first-episode schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 70(7), 672-9 (2011) doi:10.1016/j.biopsych.2011.05.017
- J. I. Friedman, C. Tang, D. Carpenter, M. Buchsbaum, J. Schmeidler, L. Flanagan, S. Golembo, I. Kanellopoulou, J. Ng, P. R. Hof, P. D. Harvey, N. D. Tsopelas, D. Stewart and K. L. Davis: Diffusion tensor imaging findings in first-episode and chronic schizophrenia patients. *Am J Psychiatry*, 165(8), 1024-32 (2008) doi:10.1176/appi.ajp.2008.07101640
- L. Yao, S. Lui, Y. Liao, M. Y. Du, N. Hu, J. A. Thomas and Q. Y. Gong: White matter deficits in first episode schizophrenia: an activation likelihood estimation meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 45, 100-6 (2013) doi:10.1016/j.pnpbp.2013.04.019
- T. S. Eich, D. E. Nee, C. Insel, C. Malapani and E. E. Smith: Neural correlates of impaired cognitive control over working memory in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 76(2), 146-53 (2014) doi:10.1016/j.biopsych.2013.09.032
- N. A. Hubbard, J. L. Hutchison, D. Z. Hambrick and B. Rypma: The enduring effects of depressive thoughts on working memory. *J Affect Disord*, 190, 208-213 (2015) doi:10.1016/j.jad.2015.06.056
- Phillips AG, Ahn S, Floresco SB. Magnitude of dopamine release in medial prefrontal cortex predicts accuracy of memory on a delayed response task., *J Neurosci*. 2004 Jan 14;24(2):547-53.
- J. R. Gregg, N. R. Herring, A. V. Naydenov, R. P. Hanlin and C. Konradi: Downregulation of oligodendrocyte transcripts is associated with impaired prefrontal cortex function in rats. *Schizophr Res*, 113(2-3), 277-87 (2009) doi:10.1016/j.schres.2009.05.023
- P. Franke, W. Maier, C. Hain and T. Klingler: Wisconsin Card Sorting Test: an indicator of vulnerability to schizophrenia? *Schizophr Res*, 6(3), 243-9 (1992)
- M. Frascarelli, S. Tognin, A. Mirigliani, F. Parente, A. Buzzanca, M. C. Torti, E. Tinelli, F. Caramia, F. Di Fabio, M. Biondi and P. Fusar-Poli: Medial frontal gyrus alterations in schizophrenia: relationship with duration of illness and executive dysfunction. *Psychiatry Res*, 231(2), 103-10 (2015) doi:10.1016/j.psychres.2014.10.017

-
-
-

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

2. Animal procedures

Animals will be exposed to a pharmacological manipulation followed by behavioural characterization. Duration is as follows.

Pharmacological compounds will be administered either via intraperitoneal/subcutaneous injections or via the food/water supply 1 or 2 times daily for a minimum of 7 and a maximum of 21 days. Followed by:

- Groups 1.1-1.2: direct sacrifice 24hr-10 days after the last injection. The variable time of sacrifice has to do with the different mechanisms of action of the drugs, for example: the myelination process is not immediate, influences on this system need time to exert their effects.

If a compound is effective in group 1.1 and 1.2, groups 1.3-1.6 will be added.

- Group 1.3 and 1.4:

The choice of these tests depends on the results of DAP2. We will choose the behavioural tests that show the largest differences in behaviour between [redacted] and [redacted] rats. If all tests show differences we will do all, if two of them show differences we will only perform those two, if only one test shows a difference during characterization we will perform only that test.

- Group 1.5 and 1.6: [redacted] (2 hours per day for 6 weeks).

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

3. Statistical methods

Data are analysed by two-way ANOVAs, using rat line and manipulation as between subjects factor. Group sizes will be determined using a power analysis. Based on our previous work and experience we estimate group sizes at 15 per genotype.

B. The animals

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

1. Choice and justification of animals

We use the apomorphine-susceptible (██████████) rats and their appropriate controls (██████████) to model SZ-like characteristics. The ██████████ rat lines are bred by our group at the Nijmegen animal facility.

Importantly, there is a lack of insight into sex differences in mechanisms underlying SZ (Kelly et al., 2016, Crawford et al., 2016, Seney et al., 2014). We cannot mix the sexes in one group, as sex differences have been reported in measures we apply (Granger et al., 2016, Grandhi et al., 2016, Evans et al., 2015). ██████████

Pharmacological manipulation with ██████████ Dose-response curve establishment will have to be examined in pilot experiments. To this end we will use 6 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 3 doses, **2 life stages: 6 x 2 x 1 x 3 x 2 = 72 animals**. We significantly reduce the number of animals used here by only asking for 1 sex and **2 lifestages**. This should be enough to establish a dose-response curve.

Pharmacological manipulation with ██████████ will be performed at two ages. The first age is between PND7 and PND90. This mimics the preadolescent and adolescent periods, in this way we can investigate the preventative use of drugs. The second age is during adulthood to investigate the use of drugs to treat myelination deficits. **It is important to do a dose-response curve establishment in both age groups, because the effective dose of the drug can differ at different ages (Echeverria et al., 1975, d'Hollander et al., 1982).**

So for pharmacological manipulation we will need in a GO situation: 15 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 8 experimental groups (6 experimental groups plus 2 extra activity control groups for the behavioural tests), 2 life stages: $15 \times 2 \times 1 \times 8 \times 2 = 480$ rats. (In a NO GO situation we will only use: 15 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 2 experimental groups, 2 life stages: $15 \times 2 \times 1 \times 2 \times 2 = 120$ rats)

We will target ██████████, so we will need **4 x 72 = 288** rats for dose response curves plus 4 x 480 = 1920 rats for pharmacological manipulation in a GO situation (and 4 x 120 = 480 rats in a NO GO situation).

Pharmacological manipulation with antioxidants

Dose-response curve establishment will have to be examined in pilot experiments. To this end we will use 6 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 3 doses, 1 life stage: $6 \times 2 \times 1 \times 3 \times 1 = 36$ animals. We significantly reduce the number of animals used here by only asking for 1 sex and 1 lifestage. This should be enough to establish a dose-response curve, **and in this case we use only 1 life stage because we would like to test ██████████ at only one age (see below).**

██████████ we would like to test at only one age: from PND28 (weaning) onwards, to test their preventative use. So for pharmacological manipulation with antioxidants we will need in a GO situation: 15 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 8 experimental groups (6 experimental groups plus 2 extra activity control groups for the behavioural tests), 1 life stage: $15 \times 2 \times 1 \times 8 \times 1 = 240$ rats. (In a NO GO situation we will only use: 15 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 2 experimental groups, 1 life stage: $15 \times 2 \times 1 \times 2 \times 1 = 60$ rats)

Our motivation to test [REDACTED]

There are 2 [REDACTED] that we would like to test, so we will need $2 \times 36 = 72$ animals for dose response establishment and $2 \times 240 = 480$ rats for pharmacological manipulations in a GO situation (and $2 \times 60 = 120$ rats in a NO GO situation).

For a detailed description of every drug that we would like to test, please see 'research strategy' in the project proposal

We would like to test 2 different drugs [REDACTED] 2 compounds targeting [REDACTED] and 2 [REDACTED]. Until this day optimal doses of these drugs to target myelination in the rat are unknown, therefore doing these dose-response curves will be necessary. However, if in the mean time literature emerges that shows effectiveness of one of the drugs on myelination level in the rat we will adapt the dose used there and skip the pilot experiment to reduce the number of animals used.

Cited work (in order of appearance)

- D. L. Kelly, L. M. Rowland, K. M. Patchan, K. Sullivan, A. Earl, H. Raley, F. Liu, S. Feldman and R. P. McMahon: Schizophrenia clinical symptom differences in women vs. men with and without a history of childhood physical abuse. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health*, 10, 5 (2016) doi:10.1186/s13034-016-0092-9
- M. B. Crawford and L. E. DeLisi: Issues related to sex differences in antipsychotic treatment. *Curr Opin Psychiatry* (2016) doi:10.1097/yco.0000000000000243
- M. L. Seney and E. Sibille: Sex differences in mood disorders: perspectives from humans and rodent models. *Biol Sex Differ*, 5(1), 17 (2014) doi:10.1186/s13293-014-0017-3
- M. W. Granger, B. Franko, M. W. Taylor, C. Messier, P. S. George-Hyslop and S. A. Bennett: A TgCRND8 Mouse Model of Alzheimer's Disease Exhibits Sexual Dimorphisms in Behavioral Indices of Cognitive Reserve. *J Alzheimers Dis* (2016) doi:10.3233/jad-150587
- R. V. Grandhi, K. Gourishetti, A. Kishore and K. Nandakumar: Assessment of female rats for studying episodic memory and its deficit associated with doxorubicin-induced chemobrain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2016) doi:10.1111/1440-1681.12568

- K. L. Evans and E. Hampson: Sex-dependent effects on tasks assessing reinforcement learning and interference inhibition. *Front Psychol*, 6, 1044 (2015) doi:10.3389/fpsyg.2015.01044
- Echeverria P, Siber GR, Paisley J, Smith AL, Smith DH, Jaffe N, et al. Age-dependent dose response to gentamicin. *The Journal of pediatrics* 1975; 87(5): 805-808
- d'Hollander A, Massaux F, Nevelsteen M, Agoston S. Age-dependent dose-response relationship of ORG NC 45 in anaesthetized patients. *British journal of anaesthesia* 1982; 54(6): 653-657.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|---------|--------------|---------------------------|-------------------|
| █ | own breeding | 552 | (pre-)adolescence |
| █ | own breeding | 552 | (pre-)adolescence |
| █ | own breeding | 552 | adulthood |
| █ | own breeding | 552 | adulthood |
| █ | own breeding | 276 | young |
| █ | own breeding | 276 | young |

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 rat is the best animal model to study human psychiatric disorders. Because of the complexity of these disorders biologically as well as phenotypically, it is impossible to use lower-order animals or organs. In addition, specific brain mechanisms, such as myelination, cannot be studied *in vivo* in humans, because of ethical restraints.

Reduction: A reduction in the number of animals per group would reduce statistical power needed to demonstrate effects. Importantly, we reduced the number of animals by using one group of animals for different behavioural characterizations after the manipulation. In addition we reduce animals by using only one group of animals for molecular characterization and only one group for cellular characterization after pharmacological manipulation. We could have chosen to look at all molecular/cellular/structural determinants of myelination that we look at in DAP1, but we decided to reduce the number of animals that 2 of these measures that prove most reliable in DAP1 will have to suffice. In addition we use only 1 activity control group for both the [REDACTED] instead of one group per test. Also, the pharmacological manipulation or vehicle followed by [REDACTED] g will only be performed when [REDACTED] proves significantly different between [REDACTED] and [REDACTED] rats in DAP2 experiments.

Refinement: To measure SZ-related symptoms the rats have to be exposed behavioural tests. This can be stressful. The analyses we propose here cannot be performed without sacrificing animals. As usual, all efforts will be undertaken to minimize animal suffering during all procedures and the sacrifice. Only experienced researchers will work with the animals.

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

2. Measures to minimise adverse effects

To minimize adverse effects during all procedures only experienced researchers will perform them. The sacrifice will be performed in a separate room as fast as possible so the rats do not experience unnecessary stress and will not suffer. In addition to that, rats are socially housed and have cage enrichment. During pharmacological manipulation and behavioural testing rats will be handled, this helps to reduce the stress and pain of injections.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Injections during the pharmacological manipulations can be painful. However, these injections will only hurt the rat for a second, therefore pain relief will not be necessary. Moreover, the rats will be handled by the researcher doing the injections. This helps to reduce the pain, because the rats get used to the experimenter and are relaxed while receiving the injection this reduces injection pain significantly.

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?

Drug administration is associated with mild pain. Rats are handled very well by the researcher doing the injection, this helps the rat to relax and reduces injection pain significantly. It could be that the medications themselves have adverse effects on the well being of the rats. Rats will hence be checked daily for these effects. In addition, the rats experience psychological stress in the behavioural tests, but this is not associated with physical pain or damage. Some of the tests involve food rewards that will be given in the form of sucrose pellets, rats like sucrose a lot, and therefore these tests are a pleasurable activity for the animals. For the [REDACTED] and [REDACTED] rats the breeding also involves a mild discomfort as animals are weaned at PND28 instead of the usual PND21. This mild discomfort is because the pups are getting heavier, and hence have less space in the cage.

Explain why these effects may emerge.

Rats are exposed to novel test cages, which may cause stress and injections that might be painful. The medications might also have negative effects on the wellbeing of the rats. Finally, since rats like sucrose a lot, the sucrose consumption and latent inhibition tests are expected to be a pleasurable activity for the animals.

The rats will receive treatment and be exposed to behavioural tests. The tests are stressful, but at the psychological level, not at the level of pain. Therefore, no pain killers will be used.

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

Rats are socially housed with cage enrichment, which contributes to stress reduction. The rats will also only be handled by experienced researchers, and by the same researchers throughout the experiments. This way the rats get used to being picked up, which is necessary for placing the rats in the test apparatus and giving the rats injections. Handling reduces stress a lot.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

General humane endpoints will apply: Piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor coat conditions, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, red fur, elephants teeth.
Extra humane endpoints will be applied for the effects of the medications and the injections: severe skin wounds, weight loss (> 15%), immobility, poor coat conditions and loss of function of any body parts.

Indicate the likely incidence.

<2% this percentage is based on our extensive experience.

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).

During the pharmacological manipulation and the behavioural tests rats will experience mild stress. The breeding of [REDACTED] and [REDACTED] animals is classified as mild discomfort.

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.

We need the rat brains to analyse the effects.

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'. | 10300 | | | | | |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|--------------------------|---|--------------------------|--|
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen | | | | | |
| 1.3 | List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form. | <table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="616 798 795 833">Serial number</th> <th data-bbox="1355 798 2083 833">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="616 833 795 952">4</td> <td data-bbox="1355 833 2083 952">Behavioural manipulation</td> </tr> </tbody> </table> | Serial number | Type of animal procedure | 4 | Behavioural manipulation | |
| Serial number | Type of animal procedure | | | | | | |
| 4 | Behavioural manipulation | | | | | | |

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.

1. Experimental approach and primary outcome parameters

Animals will be subjected to a behavioural manipulation with the goal to normalize myelin abnormalities and behaviour. After the experiment ends rats are sacrificed by decapitation without anaesthesia or by perfusion with 1-4% PFA (with or without 0.5-2% GA) under anaesthesia. The behavioural manipulations will aim to rescue myelin and behavioural abnormalities. In the [REDACTED] rats we have seen, as mentioned above, that in specifically the prefrontal cortex the myelination-related mRNA's are downregulated. The behavioural manipulations we chose aim to rescue this. Myelination is not a rigid process, but a rather plastic event. The plasticity in the formation and retraction of myelin sheaths by OLs occurs from early childhood into adulthood (Chang, Nishiyama et al. 2000, Rivers, Young et al. 2008, Purves 2012). For instance, learning to play piano leads to an increase in WM density in certain areas of the motor cortex and neuronal activity increases myelin sheath production (Bengtsson, Nagy et al. 2005, Mensch, Baraban et al. 2015). Neuronal activity can instruct OPCs to divide and mature, and eventually leads to increases in myelination associated with improved behavioural performance (Gibson, Purger et al. 2014). In a rodent model of prolonged social isolation, myelination is impaired and myelin-related gene expression reduced. This normalized when social isolation was ended (Liu, Dietz et al. 2012). Additionally, when social isolation occurs in a critical period for myelin development in the PFC, the resulting hypomyelination cannot be reversed (Makinodan, Rosen et al. 2012). Interestingly, an enriched environment has been shown to have a positive effect on both myelination and cognition (Tomlinson et al., 2015). This means that behavioural tasks could promote myelination via neural activation and social interaction, while the opposite is also true.

[REDACTED] If we find a positive effect of [REDACTED] on myelination, this may have implications for the development of new behavioural therapies in SZ.

The other behavioural manipulation we would like to perform is the [REDACTED]

[REDACTED] The rats learn to perform an interesting test in which hippocampus and prefrontal cortex activation are required.

[REDACTED] This manipulation will give us the opportunity to see the effect of training brain circuits on the myelination of these circuits. This would provide a scientific groundwork for the development of cognitive behavioural therapies that target specific brain circuits and could be very helpful for the future treatment of SZ.

Group 1: Behavioural manipulation by the [REDACTED]

Behavioural manipulation 1 will consist of the [REDACTED] This will be followed by either behavioural or molecular/cellular characterization.

- Group 1.1: [REDACTED]; molecular characterization
- Group 1.2: activity control group; molecular characterization

· Group 1.3 molecular characterization (no manipulation control group, we cannot use animals from DAP1 here because the rats need to be sacrificed at the same time in the same setting to make a reliable comparison and we would like to be able to perform the DAP1 experiments before this experiment to choose the molecular outcome parameter that shows the largest [redacted] versus [redacted] difference)

GO/NO GO point: If the groups 1.1-1.3 reveal that the [redacted] test is effective in inducing myelination we will also use groups 1.4-1.6

· Group 1.4: [redacted] and behavioural testing. The two behavioural tests that show the largest cognitive deficit in DAP2 will be repeated if only one test shows a difference during characterization we will perform only that test and if set-shifting shows the largest differences we will only use set-shifting.

· Group 1.5: Activity control group and behavioural testing. The two behavioural tests that show the largest cognitive deficit in DAP2 will be repeated if only one test shows a difference during characterization we will perform only that test and if [redacted] the largest differences we will only use [redacted].

· Group 1.6: behavioural testing. The two behavioural tests that show the largest cognitive deficit in DAP2 will be repeated if only one test shows a difference during characterization we will perform only that test and if [redacted] shows the largest differences we will only use [redacted]. The behavioural tests to be used will be the ones that shows the largest difference in cognitive ability of [redacted] versus [redacted] rats in DAP2. A maximum of two behavioural tests will be used, these tests will be the most effective ones. If [redacted] is shows the largest differences we will perform only [redacted].

In group 1.1-1.3 we will choose the molecular outcome parameter of DAP1 which shows the largest differences between [redacted] and [redacted] rats. We could of course propose to do the pharmacological manipulation followed by all the outcome parameters at the molecular/cellular/structural/functional levels that we will measure in DAP1. However, showing the effects of a pharmacological compound in 1 reliably different outcome measures should be enough to gain convincing results on the effectiveness of a behavioural therapy to treat myelin abnormalities.

Group 2: Behavioural manipulation by [redacted]

Behavioural manipulation 2 will consist of an [redacted] paradigm.

This will be followed by either behavioural or molecular/cellular characterization

· Group 2.1: [redacted]; molecular characterization

· Group 2.2: [redacted]; molecular characterization

· Group 2.3: [redacted]; molecular characterization (no manipulation control group, this group cannot be substituted with a group from DAP1 because the rats have to be sacrificed at the same time and in the same setting to provide a reliable control group)

GO/NO GO point: If the groups 2.1-2.3 reveal that the [redacted] paradigm test is effective in inducing myelination we will also use groups 2.4-2.6

· Group 2.4: [redacted]; behavioural testing. The two behavioural tests that show the largest cognitive deficit in DAP2 will be repeated if only one test shows a difference during characterization we will perform only that test and if [redacted] shows the largest differences we will only use [redacted].

· Group 2.5: [redacted]; behavioural testing. The two behavioural tests that show the largest cognitive deficit in DAP2 will be repeated if only one test shows a difference during characterization we will perform only that test and if [redacted] shows the largest differences we will only use [redacted].

· Group 2.6: [redacted]; behavioural testing. The two behavioural tests *that show the largest cognitive deficit* in DAP2 will be repeated if only one test shows a difference during characterization we will perform only that test and if [redacted] shows the largest differences we will only use [redacted].

(no manipulation control group, this group cannot be substituted with a group from DAP1 because the rats have to be sacrificed at the same time and in the same setting to provide a reliable control group)

The behavioural tests to be used will be the ones *that shows the largest difference* in cognitive ability of [redacted] versus [redacted] rats in DAP2. A maximum of two behavioural tests will be used, these tests will be the most effective ones. If [redacted] is shows the largest differences we will perform only [redacted].

In group 2.1-2.3 we will choose the molecular outcome parameter of DAP1 which shows the largest differences between [redacted] and [redacted] rats. This way we can reduce the number of animals significantly. We could of course propose to do the pharmacological manipulation followed by all the outcome parameters at the molecular/cellular/structural/functional levels that we will measure in DAP1. However, showing the effects of a pharmacological compound in 1 reliably different outcome measures should be enough to gain convincing results on the effectiveness of a behavioural therapy to treat myelin abnormalities.

Outcome measures:

Behavioural manipulations:

[redacted]

Outcome measures behavioural tests and molecular/cellular characterization:

[redacted]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted text block]



Cited work (in order of appearance)

- Purves: Neuroscience. Sinauer Associates, Incorporated, (2012)
- A. Chang, A. Nishiyama, J. Peterson, J. Prineas and B. D. Trapp: NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci*, 20(17), 6404-12 (2000)
- L. E. Rivers, K. M. Young, M. Rizzi, F. Jamen, K. Psachoulia, A. Wade, N. Kessaris and W. D. Richardson: PDGFRA/NG2 glia generate myelinating oligodendrocytes and piriform projection neurons in adult mice. *Nat Neurosci*, 11(12), 1392-401 (2008) doi:10.1038/nn.2220
- S. L. Bengtsson, Z. Nagy, S. Skare, L. Forsman, H. Forssberg and F. Ullen: Extensive piano practicing has regionally specific effects on white matter development. *Nat Neurosci*, 8(9), 1148-50 (2005) doi:10.1038/nn1516
- S. Mensch, M. Baraban, R. Almeida, T. Czopka, J. Ausborn, A. El Manira and D. A. Lyons: Synaptic vesicle release regulates myelin sheath number of individual oligodendrocytes in vivo. *Nat Neurosci* (2015) doi:10.1038/nn.3991
- E. M. Gibson, D. Purger, C. W. Mount, A. K. Goldstein, G. L. Lin, L. S. Wood, I. Inema, S. E. Miller, G. Bieri, J. B. Zuchero, B. A. Barres, P. J. Woo, H. Vogel and M. Monje: Neuronal activity promotes oligodendrogenesis and adaptive myelination in the mammalian brain. *Science*, 344(6183), 1252304 (2014) doi:10.1126/science.1252304
- 70. J. Liu, K. Dietz, J. M. DeLoyht, X. Pedre, D. Kelkar, J. Kaur, V. Vialou, M. K. Lobo, D. M. Dietz, E. J. Nestler, J. Dupree and P. Casaccia: Impaired adult myelination in the prefrontal cortex of socially isolated mice. *Nat Neurosci*, 15(12), 1621-3 (2012) doi:10.1038/nn.3263

- Tomlinson L, Leiton CV, Colognato H. Behavioral experiences as drivers of oligodendrocyte lineage dynamics and myelin plasticity. *Neuropharmacology*. 2015 Sep 28. pii: S0028-3908(15)30108-8. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.09.016.
- J. C. Talpos, N. Aerts, L. Fellini and T. Steckler: A touch-screen based paired-associates learning (PAL) task for the rat may provide a translatable pharmacological model of human cognitive impairment. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 122, 97-106 (2014) doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbb.2014.03.014>
- J. R. Gregg, N. R. Herring, A. V. Naydenov, R. P. Hanlin and C. Konradi: Downregulation of oligodendrocyte transcripts is associated with impaired prefrontal cortex function in rats. *Schizophr Res*, 113(2-3), 277-87 (2009) doi:10.1016/j.schres.2009.05.023
- J. I. Friedman, C. Tang, D. Carpenter, M. Buchsbaum, J. Schmeidler, L. Flanagan, S. Golembo, I. Kanellopoulou, J. Ng, P. R. Hof, P. D. Harvey, N. D. Tsopelas, D. Stewart and K. L. Davis: Diffusion tensor imaging findings in first-episode and chronic schizophrenia patients. *Am J Psychiatry*, 165(8), 1024-32 (2008) doi:10.1176/appi.ajp.2008.07101640
- L. Yao, S. Lui, Y. Liao, M. Y. Du, N. Hu, J. A. Thomas and Q. Y. Gong: White matter deficits in first episode schizophrenia: an activation likelihood estimation meta-analysis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 45, 100-6 (2013) doi:10.1016/j.pnpbp.2013.04.019
- T. S. Eich, D. E. Nee, C. Insel, C. Malapani and E. E. Smith: Neural correlates of impaired cognitive control over working memory in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 76(2), 146-53 (2014) doi:10.1016/j.biopsych.2013.09.032
- N. A. Hubbard, J. L. Hutchison, D. Z. Hambrick and B. Rypma: The enduring effects of depressive thoughts on working memory. *J Affect Disord*, 190, 208-213 (2015) doi:10.1016/j.jad.2015.06.056
- Phillips AG, Ahn S, Floresco SB. Magnitude of dopamine release in medial prefrontal cortex predicts accuracy of memory on a delayed response task. *J Neurosci*. 2004 Jan 14;24(2):547-53.
- P. Franke, W. Maier, C. Hain and T. Klingler: Wisconsin Card Sorting Test: an indicator of vulnerability to schizophrenia? *Schizophr Res*, 6(3), 243-9 (1992)
- M. Frascarelli, S. Tognin, A. Mirigliani, F. Parente, A. Buzzanca, M. C. Torti, E. Tinelli, F. Caramia, F. Di Fabio, M. Biondi and P. Fusar-Poli: Medial frontal gyrus alterations in schizophrenia: relationship with duration of illness and executive dysfunction. *Psychiatry Res*, 231(2), 103-10 (2015) doi:10.1016/j.psychres.2014.10.017

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

2. Animal procedures

Animals will be exposed to either the [REDACTED], or [REDACTED] followed by behavioural characterization. Duration is as follows.

Either [REDACTED] (2 hours per day for 3 weeks) or [REDACTED] (paradigm will be applied with a maximum duration of 2 months) followed by:

- Groups 1.1-1.3 and 2.1-2.3: decapitation 24 hours after the end of the paradigm or up to 7 days later to allow for the changes to the myelin to be made.

Groups 1.4-1.6 and 2.4-2.6 will only be used when in groups 1.1-1.3 and 2.1-2.3 effectiveness of the treatment has been found.

- Group 1.4-1.6 and 2.4-2.6: behavioural tests (see DAP2 for times, up to two tests will be performed or only [REDACTED] will be performed depending on DAP2 results) and decapitation.

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

3. Statistical methods

Data are analysed by two-way ANOVAs, using rat line and manipulation as between subjects factor. Group sizes will be determined using a power analysis. Based on our previous work and experience we estimate group sizes at 15 per genotype. We have minimized the number of groups by using one group of animals for molecular/cellular characterization, instead of a control group in every manipulation experiment.

B. The animals

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

1. Choice and justification of animals

We use the apomorphine-susceptible [REDACTED] rats and their appropriate controls ([REDACTED]) to model SZ-like characteristics. The [REDACTED]

[REDACTED] S rat lines [REDACTED]

Importantly, there is a lack of insight into sex differences in mechanisms underlying SZ (Kelly et al., 2016, Crawford et al., 2016, Seney et al., 2014). We cannot mix the sexes in one group, as sex differences have been reported in measures we apply (Granger et al., 2016, Grandhi et al., 2016, Evans et al., 2015). [REDACTED], hence we will

only perform our experiments in male rats.

[REDACTED] will be performed only during adulthood.

So for [REDACTED] we will need in a GO situation: 15 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 7 experimental groups (6 experimental groups plus 1 activity control groups for the behavioural tests), 1 life stage: $15 \times 2 \times 1 \times 7 \times 1 = 210$ rats.

In a NO GO situation we will only use: 15 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 3 experimental groups, 1 life stage: $15 \times 2 \times 1 \times 3 \times 1 = 90$ rats.

[REDACTED] will be performed from PND28 (weaning) onwards because it concerns housing conditions.

So for [REDACTED] we will need in a GO situation: 15 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 7 experimental groups (6 experimental groups plus 1 activity control groups for the behavioural test), 1 life stage: $15 \times 2 \times 1 \times 7 \times 1 = 210$ rats. **In a NO GO situation we will only use:** 15 rats per genotype, 2 genotypes, 1 sex, 3 experimental groups, 1 life stage: $15 \times 2 \times 1 \times 3 \times 1 = 90$ rats.

Cited work (in order of appearance)

- D. L. Kelly, L. M. Rowland, K. M. Patchan, K. Sullivan, A. Earl, H. Raley, F. Liu, S. Feldman and R. P. McMahon: Schizophrenia clinical symptom differences in women vs. men with and without a history of childhood physical abuse. *Child Adolesc Psychiatry Ment Health*, 10, 5 (2016) doi:10.1186/s13034-016-0092-9
- M. B. Crawford and L. E. DeLisi: Issues related to sex differences in antipsychotic treatment. *Curr Opin Psychiatry* (2016) doi:10.1097/yco.0000000000000243
- M. L. Seney and E. Sibille: Sex differences in mood disorders: perspectives from humans and rodent models. *Biol Sex Differ*, 5(1), 17 (2014) doi:10.1186/s13293-014-0017-3
- M. W. Granger, B. Franko, M. W. Taylor, C. Messier, P. S. George-Hyslop and S. A. Bennett: A TgCRND8 Mouse Model of Alzheimer's Disease Exhibits Sexual Dimorphisms in Behavioral Indices of Cognitive Reserve. *J Alzheimers Dis* (2016) doi:10.3233/jad-150587
- R. V. Grandhi, K. Gourishetti, A. Kishore and K. Nandakumar: Assessment of female rats for studying episodic memory and its deficit associated with doxorubicin-induced chemobrain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (2016) doi:10.1111/1440-1681.12568
- K. L. Evans and E. Hampson: Sex-dependent effects on tasks assessing reinforcement learning and interference inhibition. *Front Psychol*, 6, 1044 (2015) doi:10.3389/fpsyg.2015.01044

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|----------------|--------------|---------------------------|------------|
| Rat [REDACTED] | Own breeding | 105 | adulthood |
| Rat [REDACTED] | Own breeding | 105 | adulthood |

| | | | |
|----------------|--------------|-----|-------|
| Rat [REDACTED] | Own breeding | 105 | PND28 |
| Rat [REDACTED] | Own breeding | 105 | PND28 |

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 rat is the best animal model to study human psychiatric disorders. Because of the complexity of these disorders biologically as well as phenotypically, it is impossible to use lower-order animals or organs. In addition, specific brain mechanisms, such as myelination, cannot be studied *in vivo* in humans, because of ethical restraints.

Reduction: A reduction in the number of animals per group would reduce statistical power needed to demonstrate effects. Importantly, we reduced the number of animals by using one group of animals for different behavioural characterizations after the manipulation. In addition we reduce animals by using only one group of animals for molecular characterization after manipulations. We could have chosen to look at all molecular/cellular/structural determinants of myelination that we look at in DAP1, but we decided to reduce the number of animals so that 2 of these measures that prove most reliable in DAP1 will have to suffice. Also, the [REDACTED] with their respective control groups followed by behavioural testing will only be performed when these paradigms are proven successful at inducing myelination.

Refinement: To measure SZ-related symptoms the rats have to be exposed to behavioural tests. This can be stressful. The analyses we propose here cannot be performed without sacrificing animals. As usual, all efforts will be undertaken to minimize animal suffering during all procedures and the sacrifice. Only experienced researchers will work with the animals.

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

To minimize adverse effects during all procedures only experienced researchers will perform them. The sacrifice will be performed in a separate room as fast as possible so the rats do not experience unnecessary stress and will not suffer. In addition to that, rats are socially housed ([REDACTED]) and have cage enrichment. In addition rats will be handled during [REDACTED] and during the behavioural tests, this helps reducing the stress during the experiments. In addition, the same researchers will be involved in one experiment, that way the rats can get used to the experimenter which reduces stress.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

G. Location where the animals procedures are performed

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?

The rats experience psychological stress in the behavioural tests, but this is not associated with physical pain or damage. In addition the rats will be handled by the researchers that do the experiment, which reduces stress. [REDACTED]
[REDACTED], this is a pleasurable activity for the rats. [REDACTED]
might cause stress. In addition, the rats that will do the [REDACTED] paradigm will be food deprived for a short period right before the test, this can be stressful for the rats. However, during the test they can earn food rewards, and after testing they will have ad libitum access to food. Also their

weight will be measured daily to ensure that they do not lose weight. In addition, as sucrose is used as a reward this is pleasurable for the rats. For the [REDACTED] and [REDACTED] rats the breeding also involves a mild discomfort as animals are weaned at PND28 instead of the usual PND21. This mild discomfort is because the pups are getting heavier, and hence have less space in the cage.

Explain why these effects may emerge.

Rats are exposed to novel test cages, which may cause stress. This stress is about equal to cage cleaning. Since rats like sucrose a lot, the [REDACTED] paradigm is expected to be a pleasurable activity for the animals. However, the small timeperiod of food deprivation right before the [REDACTED] test could be stressful for the animals. Also in the [REDACTED] rats are socially housed in large cages and have access to more than the standard enrichment, this is very pleasurable activity for the rats. During [REDACTED] rats can experience stress because they are housed alone.

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

Rats are socially housed with cage enrichment, this reduces stress. [REDACTED] this will be a nice experience for the rats. [REDACTED], which might be stressful. However, during testing the rats will be handled by the researchers to reduce stress. In addition, only experienced researchers will work with the animals. The rats that will do the [REDACTED] paradigm will be food deprived for a short period right before the test, this can be stressful for the rats. However, during the test they can earn food rewards, and after testing they will have ad libitum access to food. We will measure their weight daily, and when severe weight loss occurs we will shorten the time period of food deprivation before testing.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

General humane endpoints will apply: Piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor coat conditions, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, red fur, elephants teeth.

Indicate the likely incidence.

<2% this number is based on our extensive experience in animal research

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).

During the [REDACTED] and behavioural testing **350 rats (83.33 % of all rats in this DAP)** will experience mild stress . During [REDACTED] **70 rats (16.66 % of all rats in this DAP)** will experience moderate stress levels due to the long time period of social isolation. The breeding of [REDACTED] and [REDACTED] animals is classified as mild discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

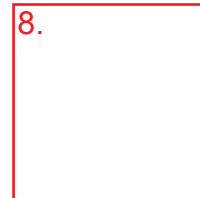
Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

We need the rat brains to analyse the effects.

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

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

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD103002017865

Bijlagen

2

Datum 10 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 10 februari 2017. Het gaat om uw project "Myelination in schizophrenia: mechanisms and therapeutics". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002017865. 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:

10 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD103002017865

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
10 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017865

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
10 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017865

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 10 maart 2017
Geplande einddatum: 10 maart 2022
Titel project: Myelination in schizophrenia: mechanisms and therapeutics
Titel niet-technische samenvatting: Myelinatieveranderingen in schizofrenie: mechanismen en behandelingen
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
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: Nijmegen
Datum: 10 februari 2017

Datum:
10 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017865



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Geert Groteplein 10

Postbus Postbus 9101, [redacted]
6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD103002017865

Bijlagen

2

Datum 10 februari 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 10 februari 2017

Vervaldatum: 12 maart 2017

Factuurnummer: 170865

Ordernummer: Kostenplaats en kostensoort: 040823-461220 [redacted]

projectnummer: 2015-0125 Verantwoordelijk onderzoeker: [redacted]

| Omschrijving | Bedrag |
|----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002017865 | € 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.

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2015-0125
2. Titel van het project: Myelination in schizophrenia: mechanisms and therapeutics
3. Titel van de NTS: Myelinatieveranderingen in schizofrenie: mechanismen en behandelingen

4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
 -

6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 07-10-2016
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 01-11-2016, 06-12-2016 en 10-01-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 08-11-2016 tot 23-11-2016 en van 14-12-2016 tot 20-12-2016
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 23-11-2016 en 20-12-2016
 - advies aan CCD: 09-02-2017

7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.

8. Eventueel horen van aanvrager:
 - Datum
 - 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: 08-11-2016
 - Datum antwoorden: 23-11-2016
 - Gestelde vragen en antwoorden:
Project Proposal:
-3.1 De [REDACTED] rat is één van de diermodellen voor schizofrenie. De uitgebreide moleculaire, cellulaire en structurele karakterisering van de prefrontale cortex van deze dieren (DAP1) zal uitwijzen of deze dieren een afwijking in myelinisatie van de prefrontale cortex hebben (ten opzichte van normale Wistar ratten) die vergelijkbaar is met de afwijkingen die in schizofrenie patiënten worden gezien. De commissie is van mening dat zich hier een belangrijk beslismoment bevindt. Indien de afwijkingen in myelinisatie van de



[Redacted text]

Daarom is het nu van belang te onderzoeken wat het effect van interventies op de myeline niveaus in de PFC en op het gedrag van [redacted] ratten is. Dit onderzoek zou gevolgen kunnen hebben voor nieuwe behandelingenstrategieën in SZ, juist omdat het ziekte beeld in de PFC van patiënten zo goed over overeenkomt met wat wij zien in ons model. DAP1 is slechts bedoeld als aanvullend onderzoek naar de mechanismen die ten grondslag liggen aan de myelinatie defecten. Om deze redenen zouden wij graag onze DEC indienen met alle 4 de DAPs.

-3.2 Er wordt een aantal argumenten aangedragen waaruit de haalbaarheid van het project zou moeten blijken. De commissie adviseert enkele key publications te noemen die deze argumenten ondersteunen.
Antwoord: Publicaties zijn toegevoegd aan de tekst onder 3.2 in de projectaanvraag.

-3.4.1 De karakterisatie van niveau 1 is al erg omvangrijk: uit de beschrijving van DADP1 blijkt dat er 9 primaire uitkomstparameters onderzocht zullen worden om de myelinisatie van de prefrontale cortex te karakteriseren. De commissie vermoedt dat deze uitgebreide karakterisatie, nog exclusief de gedragstesten, al enkele jaren in beslag zal nemen. Zij vraagt zich daarom af of al het in deze projectaanvraag beschreven onderzoek wel in 5 jaar uitgevoerd kan worden.
Antwoord: De meeste technieken die wij noemen in DAP1 zijn al opgezet in ons lab of doen wij in samenwerking met andere laboratoria waar de expertise en materialen aanwezig zijn om de technieken uit te voeren. Bijvoorbeeld, de mRNA- en eiwitexpressie van myeline-gerelateerde componenten worden routinematig uitgevoerd in ons lab. Dit geldt ook voor de [redacted]. Deze zijn opgezet en uitvoerbaar op korte termijn. De [redacted] worden gedaan in samenwerking met de groep van [redacted]. Zij hebben de expertise en zullen deze experimenten voor ons uitvoeren. Daarbij hebben wij een directe samenwerking met het lab van [redacted]. Zijn groep is gespecialiseerd in electronen microscopie voor de visualisatie van myeline en in electrofysiologie van OPCs. Met behulp van de expertise die aanwezig is in ons lab en de samenwerking met andere specialisten zijn de experimenten beschreven in DAP1 realistisch en haalbaar binnen de voorgestelde termijn. Om het aantal dieren te verminderen en de haalbaarheid te verbeteren is de groep 'metabolic state' weggelaten.

Description of Animal Procedures:

*DAP1

-A1: Wordt de prefrontale cortex als geheel onderzocht, of wordt de myelinisatie van de verschillende lagen apart geanalyseerd?

Antwoord: De myelinatie van de cortex zal in zijn geheel worden onderzocht, omdat er geen aanwijzingen zijn dat myeline veranderingen in SZ verschillen per corticale laag.

-B: Er is een gebrek aan inzicht in sexeverschillen betreffende de mechanismen die ten grondslag liggen aan schizofrenie. Wat wordt precies bedoeld met deze mededeling? Waarom willen de onderzoekers dan alle uitkomstparameters voor myelinisatie in beide sexen onderzoeken?

Antwoord: De componenten van SZ die wij onderzoeken zijn myeline en cognitie en het verband daartussen. Het is bekend dat in SZ cognitieve symptomen ernstiger naar voren komen in mannen ten op zichte van vrouwen (Kao et al., 2013; Leger & Neill, 2016). Daarom zou het mixen van de sexen onze kans verkleinen de cognitieve symptomen te ontdekken. Daarbij zijn er aanwijzingen dat er een man-vrouw verschil is in mRNA expressie in de PFC van SZ patiënten (Qin, Liu, Sodhi, & Lu, 2016). In diermodellen voor SZ wordt ook een verschil in het aantal gemyelineerde axonen gevonden tussen mannen en vrouwen en de hoeveelheid demyelinatie in een demyelinatie model wordt ook beïnvloed door sexe (Valeiras, Rosato Siri, Codagnone, Reines, & Pasquini, 2014; Wischhof, Irrsack, Osorio, & Koch, 2015).

[Redacted text]



Figuur 3. [Redacted text]

Daarom zou het mixen van de sexen bij het kijken naar myeline en oligodendrocyeten ertoe kunnen leiden dat wij een kleinere kans hebben een verschil te laten zien tussen sexen.

-B: Uit de tekst blijkt dat de onderzoekers dieren in het embryonale stadium willen gebruiken. De commissie mist een beschrijving van de myelinisatie van embryonale hersenen en de verschillen daarin die de onderzoekers verwachten tussen [Redacted] ratten en normale embryo's. Moeten de moederdieren niet ook meegeteld worden in de aanvraag?

Antwoord: Wij willen niet kijken naar de myelinatie van embryonale hersenen. Voor de techniek [Redacted] die wij beschrijven in DAP1 zijn embryonale cellen nodig. Deze cellen zullen in cultuur gebracht worden om naar de [Redacted].

[Redacted text]

-B: De benodigde groepsgrootte is geschat op basis van eerder werk en wordt op 15 gesteld voor elk van de te onderzoeken parameters. De commissie verzoekt de onderzoekers voor elk van de uitkomstparameters aan te geven hoe deze n=15 tot stand is gekomen, eventueel met verwijzing naar eerder gepubliceerd werk. Een dergelijke groepsgrootte lijkt voor een aantal uitkomstmaten (zoals bijv. imaging, EM) vrij excessief.

Antwoord: Voor [REDACTED] heeft onze groep n=12-15 gebruikt ([REDACTED]). Daarbij is de groepsgrootte bij [REDACTED] geschat op n=13-18 in eerdere experimenten waarin verschillen werden gevonden ([REDACTED]). Voor [REDACTED] verminderen wij het aantal naar n=6. Voor immunohistochemie is een n van 10 minimale groeps grootte en daarom verminderen wij deze experimenten naar n=10 zoals in eerdere publicaties van onze groep ([REDACTED]). Hetzelfde geldt voor de [REDACTED] experimenten. De experimenten waarin wij naar de [REDACTED] status van het weefsel kijken is een hoge n nodig om verschillen in bepaalde/specifieke [REDACTED] te kunnen onderscheiden en multiple testing correcties te kunnen toepassen. Zodanig houden wij n=15 per groep aan voor deze experimenten. Voor electrofysiologie in [REDACTED] ratten is n=4-6 gebruikt, daarom verminderen wij de groepen voor [REDACTED] naar n=6 per groep ([REDACTED]).

Niet-technische samenvatting:

Het taalgebruik is af en toe wel erg gepopulariseerd ('vettig goedje', 'leuke activiteit'). De commissie verzoekt u dit anders te formuleren.

Antwoord: Het taalgebruik is nu aangepast.

De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: Verdere veranderingen zijn aangebracht in de aantallen beschreven in de NTS.

Referenties

- Ellenbroek, B. A., & Cools, A. R. (2002). Apomorphine susceptibility and animal models for psychopathology: genes and environment. *Behav Genet*, 32(5), 349-361.
- Ellenbroek, B. A., Geyer, M. A., & Cools, A. R. (1995). The behavior of [REDACTED] rats in animal models with construct validity for schizophrenia. *J Neurosci*, 15(11), 7604-7611.
- Flynn, S. W., Lang, D. J., Mackay, A. L., Goghari, V., Vavasour, I. M., Whittall, K. P., . . . Honer, W. G. (2003). Abnormalities of myelination in schizophrenia detected in vivo with MRI, and post-mortem with analysis of oligodendrocyte proteins. *Mol Psychiatry*, 8(9), 811-820. doi:10.1038/sj.mp.4001337
- Hakak, Y., Walker, J. R., Li, C., Wong, W. H., Davis, K. L., Buxbaum, J. D., . . . Fienberg, A. A. (2001). Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8), 4746-4751. doi:10.1073/pnas.081071198
- Hof, P. R., Haroutunian, V., Friedrich, V. L., Jr., Byne, W., Buitron, C., Perl, D. P., & Davis, K. L. (2003). Loss and altered spatial distribution of oligodendrocytes in the superior frontal gyrus in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 53(12), 1075-1085.
- Kao, Y. C., Liu, Y. P., Lien, Y. J., Lin, S. J., Lu, C. W., Wang, T. S., & Loh, C. H. (2013). The influence of sex on cognitive insight and neurocognitive functioning in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 44, 193-200. doi:10.1016/j.pnpbp.2013.02.006
- Lauriat, T. L., Shiue, L., Haroutunian, V., Verbitsky, M., Ares, M., Jr., Ospina, L., & McInnes, L. A. (2008). Developmental expression profile of quaking, a candidate gene for schizophrenia, and its target genes in human prefrontal cortex and hippocampus shows regional specificity. *J Neurosci Res*, 86(4), 785-796. doi:10.1002/jnr.21534
- Leger, M., & Neill, J. C. (2016). A systematic review comparing sex differences in cognitive function in schizophrenia and in rodent models for schizophrenia, implications for improved therapeutic strategies. *Neurosci Biobehav Rev*, 68, 979-1000. doi:10.1016/j.neubiorev.2016.06.029

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

Mauney, S. A., Pietersen, C. Y., Sonntag, K. C., & Woo, T. U. (2015). Differentiation of oligodendrocyte precursors is impaired in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophr Res*, 169(1-3), 374-380. doi:10.1016/j.schres.2015.10.042

Qin, W., Liu, C., Sodhi, M., & Lu, H. (2016). Meta-analysis of sex differences in gene expression in schizophrenia. *BMC Syst Biol*, 10 Suppl 1, 9. doi:10.1186/s12918-015-0250-3

Stark, A. K., Uylings, H. B., Sanz-Arigita, E., & Pakkenberg, B. (2004). Glial cell loss in the anterior cingulate cortex, a subregion of the prefrontal cortex, in subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 161(5), 882-888.

Uranova, N. A., Vostrikov, V. M., Orlovskaya, D. D., & Rachmanova, V. I. (2004). Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr Res*, 67(2-3), 269-275. doi:10.1016/s0920-9964(03)00181-6

Valeiras, B., Rosato Siri, M. V., Codagnone, M., Reines, A., & Pasquini, J. M. (2014). Gender influence on schizophrenia-relevant abnormalities in a cuprizone demyelination model. *Glia*, 62(10), 1629-1644. doi:10.1002/glia.22704

Vostrikov, V. M., Uranova, N. A., Rakhmanova, V. I., & Orlovskaya, D. D. (2004). [Lowered oligodendroglial cell density in the prefrontal cortex in schizophrenia]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 104(1), 47-51.

Wischhof, L., Irrsack, E., Osorio, C., & Koch, M. (2015). Prenatal LPS-exposure--a neurodevelopmental rat model of schizophrenia--differentially affects cognitive functions, myelination and parvalbumin expression in male and female offspring. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 57, 17-30. doi:10.1016/j.pnpbp.2014.10.004

- Datum: 14-12-2016
- Datum antwoorden: 20-12-2016
- Gestelde vragen en antwoorden:

Project Proposal:

De commissie heeft de onderzoekers gevraagd om te laten zien dat myelinisatie van de prefrontale cortex van [redacted] ratten afwijkt van de myelinisatie van dit hersengebied in normale Wistar ratten. De onderzoekers antwoorden dat de [redacted] rat een betere controle is dan de gewone Wistar rat omdat de [redacted] Wistar rat (waaruit de [redacted] rat is ontstaan) niet meer bestaat. Het verbaast de commissie dan ook dat de onderzoekers toch van plan zijn om alle experimenten niet alleen in [redacted] en [redacted] ratten maar ook in Wistar ratten (welke eigen fok bedoelen de onderzoekers?) uit te voeren. Dit ofschoon daar volgens hen dan geen duidelijke rationale voor zou bestaan. Volgens de commissie is de Wistar rat echter zeker zo'n goede controle als de [redacted] rat, want als er een (causaal) verband bestaat tussen het myeline defect en schizofreen gedrag dan zal ook deze rat geen myeline defect vertonen. De commissie vindt deze dubbele controle dan ook zo zinvol dat ze bij haar verzoek blijft om de aanvraag in eerste instantie te beperken tot DAP1.

De commissie acht de uitkomsten van DAP1 noodzakelijk om een ethische afweging te kunnen maken over de vervolgentexperimenten.

Antwoord: De commissie vraagt ons de aanvraag te beperken tot DAP1 en eerst eenzelfde verschil in myelinatie te laten zien tussen [redacted] en Wistar ratten als al is geobserveerd in [redacted] ratten. Wij zijn inderdaad van mening dat de [redacted] rat een betere controle is dan de Wistar rat in experimenten waarin de [redacted] rat wordt gebruikt; al 30 jaar is de combinatie steeds geweest [redacted] met als controle [redacted]. Het ligt daarom niet direct voor de hand om Wistar ratten mee te nemen in dit onderzoek. De initiële rationale voor het meenemen van Wistar ratten in deze aanvraag was da , hoewel

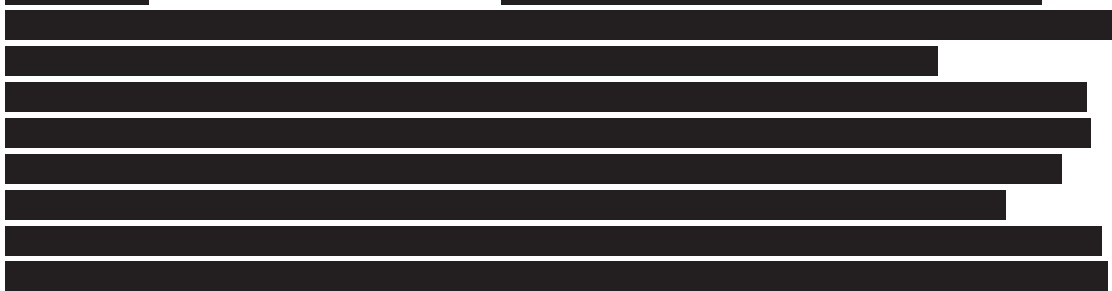
onwaarschijnlijk gezien de in het verleden gepubliceerde artikelen over ██████████ het mogelijk is dat als wij een artikel indienen voor publicatie, reviewers vragen naar de myelinatie status van Wistar ratten. Door het includeren van Wistar ratten in deze aanvraag zouden wij gemakkelijk dit soort experimenten kunnen toevoegen, mocht dit nodig zijn. Echter, zoals wij eerder al hebben aangegeven, is vanuit wetenschappelijk oogpunt de ██████████ rat een betere controle voor de ██████████ rat dan de Wistar rat (zie ook beneden). Er is dan ook geen directe noodzaak en rationale voor het meenemen van Wistar ratten in deze aanvraag; daarom hebben wij er nu voor gekozen deze weg te laten.

De ██████████ ratten zijn een betere controle voor de ██████████ ratten dan Wistar ratten omdat:

1. De ██████████ Wistar rat, waarvan de ██████████ lijnen zijn afgeleid, niet meer bestaat.
2. Wij houden tijdens onze fok van de ██████████ lijnen de genetische- en omgevingsfactoren altijd gelijk binnen onze populaties. Deze factoren zijn in Wistar ratten echter niet gelijk. Bovendien, in oudere maar ook in recente literatuur (die peer review heeft ondergaan voor publicatie) kunt u terug vinden dat als controle voor de ██████████ rat de ██████████ rat wordt gebruikt, en niet de Wistar rat (Selten et al., 2016; van Vugt et al., 2014). Het is ook belangrijk om te noemen dat omgevingsfactoren een grote invloed hebben op de myelinatie van het brein, en dat bij het vergelijken van de myelinatie tussen verschillende dieren de omgevingsfactoren zoveel mogelijk gelijk gehouden moeten worden (Liu et al., 2012; Makinodan, Rosen, Ito, & Corfas, 2012).
3. Wij zouden Wistar ratten moeten bestellen bij een bedrijf, en dan zullen deze dieren dus transport/omgevingsstress ervaren die ██████████ ratten niet ervaren. Dit soort ervaringen hebben invloed op de myelinatie van het brein en zal dus een belangrijke confounder zijn in het onderzoek (Tomlinson, Leiton, & Colognato, 2016).

Daarnaast wijzen wij graag op het feit dat het doen van de experimenten met ██████████ en Wistar ratten ertoe zou leiden dat wij nieuwe groepen ratten moeten offeren. Om op moleculair/cellulair niveau dieren te kunnen vergelijken moeten zij in dezelfde omgeving op hetzelfde tijdstip geofferd worden. Dat betekent dus dat wij opnieuw ██████████ ratten moeten offeren om dezelfde experimenten mee uit te voeren die wij al hebben gedaan met de ██████████. Dit betekent het gebruik van veel extra dieren, terwijl dit, wetenschappelijk gezien, niet absoluut noodzakelijk is.

Als laatste zouden wij graag willen noemen dat het doel van deze aanvraag is het uitvoeren van onderzoek naar nieuwe behandelingsstrategieën voor het myelinedefect in schizofrenie. Wij hebben reeds veel data verzameld over het ██████████ in onze ██████████ ratten versus ██████████ ratten. Figuur 1 laat zien dat ██████████



██████████ De verschillen die wij observeren zijn direct vergelijkbaar met de verschillen die zijn gevonden in post-mortem breinweefsel van schizofreniepatiënten versus controles: ██████████

[Redacted text block]



Figuur 1. [Redacted text block]



Figuur 2. [REDACTED]

Onze uitgebreide karakterisatie van het [REDACTED] in de [REDACTED] rat die zo goed overeenkomt met wat er wordt gevonden in schizofreniepatiënten heeft ertoe geleid dat wij deze DEC aanvraag hebben geschreven. De volgende stap in dit onderzoek is namelijk het ontwikkelen van een behandelingsstrategie om het myeline-defect te kunnen verhelpen, zodat in de toekomst nieuwe therapieën voor schizofreniepatiënten ontwikkeld kunnen worden.

Wij passen de aanvraag als volgt aan met het doel alleen dieren te gebruiken die absoluut noodzakelijk zijn en een zo hoog mogelijke wetenschappelijk belang te bereiken:

- o Wistar ratten worden in de gehele aanvraag achterwege gelaten.*
- o DAP1 omvat alleen experimenten die wij nog niet in [REDACTED] hebben uitgevoerd en die ons iets kunnen vertellen over de mechanistische achtergrond van het myelinedefect.*
- o DAP2 omvat een batterij aan gedragsexperimenten waarin wij PFC-afhankelijk gedrag*

- testen. Op deze manier kunnen wij het myelinedefect koppelen aan een gedragsdefect.
- o DAP3 omvat farmacologische interventies: hier proberen wij met [REDACTED]. GO/NO GO punt: eventueel herhalen wij na interventie de gedragstest uit DAP2 die het grootste verschil laat zien, echter alleen als er een verschil geobserveerd is in DAP2.
 - o DAP4 omvat gedragsinterventies: hier proberen wij het [REDACTED]. GO/NO GO punt: eventueel herhalen wij na interventie de gedragstest uit DAP2 die het grootste verschil laat zien, echter alleen als er een verschil geobserveerd is in DAP2.

Description of Animal Procedures:

-De myelinisatiegraad verschilt per corticale laag. Uit de antwoorden van de onderzoekers blijkt dat zij de myelinisatie van alle lagen samen zullen analyseren, omdat er geen aanwijzingen zijn dat de veranderingen in myeline verschillen per laag. Zijn er dan wel aanwijzingen dat deze veranderingen hetzelfde zijn in alle lagen? Wanneer deze verschillen er in de praktijk toch blijken te zijn (ondanks dat er nog geen aanwijzingen voor zijn), dan zouden deze onopgemerkt kunnen blijven omdat alle lagen tezamen worden geanalyseerd. *Antwoord: Wij zullen de myeline in de corticale lagen apart analyseren om zo zeker te weten dat er geen verschillen onopgemerkt blijven.*

-De onderzoekers geven aan dat de gezochte veranderingen in myelinisatie en gedrag waarschijnlijk sterker zullen zijn in mannelijke ratten. De commissie verzoekt u het onderzoek met alleen mannelijke dieren uit te voeren indien u geen gebruik wilt maken van gemengde groepen. Het feit dat er vrouwelijke dieren voorhanden zijn is geen goed argument om er proeven mee te doen, omdat het ongerief voor deze dieren toeneemt wanneer zij aan het experiment worden toegevoegd. *Antwoord: Wij zijn het met de commissie eens en zullen het onderzoek alleen in mannelijke ratten uitvoeren.*

Niet-technische samenvatting:

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS. *Antwoord: De NTS is aangepast.*

Referenties

- Flynn, S. W., Lang, D. J., Mackay, A. L., Goghari, V., Vavasour, I. M., Whittall, K. P., . . . Honer, W. G. (2003). Abnormalities of myelination in schizophrenia detected in vivo with MRI, and post-mortem with analysis of oligodendrocyte proteins. *Mol Psychiatry*, 8(9), 811-820. doi:10.1038/sj.mp.4001337
- Hakak, Y., Walker, J. R., Li, C., Wong, W. H., Davis, K. L., Buxbaum, J. D., . . . Fienberg, A. A. (2001). Genome-wide expression analysis reveals dysregulation of myelination-related genes in chronic schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(8), 4746-4751. doi:10.1073/pnas.081071198
- Hof, P. R., Haroutunian, V., Friedrich, V. L., Jr., Byne, W., Buitron, C., Perl, D. P., & Davis, K. L. (2003). Loss and altered spatial distribution of oligodendrocytes in the superior frontal gyrus in schizophrenia. *Biol Psychiatry*, 53(12), 1075-1085.
- Liu, J., Dietz, K., DeLoyht, J. M., Pedre, X., Kelkar, D., Kaur, J., . . . Casaccia, P. (2012). Impaired adult myelination in the prefrontal cortex of socially isolated mice. *Nat Neurosci*, 15(12), 1621-1623. doi:10.1038/nn.3263
- Makinodan, M., Rosen, K. M., Ito, S., & Corfas, G. (2012). A Critical Period for Social Experience-Dependent Oligodendrocyte Maturation and Myelination. *Science*, 337(6100), 1357-1360. doi:10.1126/science.1220845
- Mauney, S. A., Pietersen, C. Y., Sonntag, K. C., & Woo, T. U. (2015). Differentiation of oligodendrocyte precursors is impaired in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophr Res*, 169(1-3), 374-380. doi:10.1016/j.schres.2015.10.042
- Selten, M. M., Meyer, F., Ba, W., Valles, A., Maas, D. A., Negwer, M., . . . Martens, G. J. (2016). Increased GABAB receptor signaling in a rat model for schizophrenia. *Sci Rep*, 6, 34240. doi:10.1038/srep34240

- Stark, A. K., Uylings, H. B., Sanz-Arigita, E., & Pakkenberg, B. (2004). Glial cell loss in the anterior cingulate cortex, a subregion of the prefrontal cortex, in subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry*, 161(5), 882-888.
- Tomlinson, L., Leiton, C. V., & Colognato, H. (2016). Behavioral experiences as drivers of oligodendrocyte lineage dynamics and myelin plasticity. *Neuropharmacology*, 110(Pt B), 548-562. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.09.016
- Uranova, N. A., Vostrikov, V. M., Orlovskaya, D. D., & Rachmanova, V. I. (2004). Oligodendroglial density in the prefrontal cortex in schizophrenia and mood disorders: a study from the Stanley Neuropathology Consortium. *Schizophr Res*, 67(2-3), 269-275. doi:10.1016/s0920-9964(03)00181-6
- van Vugt, R. W., Meyer, F., van Hulten, J. A., Vernooij, J., Cools, A. R., Verheij, M. M., & Martens, G. J. (2014). Maternal care affects the phenotype of a rat model for schizophrenia. *Front Behav Neurosci*, 8, 268. doi:10.3389/fnbeh.2014.00268
- Vostrikov, V. M., Uranova, N. A., Rakhmanova, V. I., & Orlovskaya, D. D. (2004). [Lowered oligodendroglial cell density in the prefrontal cortex in schizophrenia]. *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*, 104(1), 47-51.

- 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 is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Invulling definitie project' van de CCD. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. Uit bovenstaande correspondentie met de aanvrager blijkt dat dit uitgebreid getoetst is. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.
2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het gedetailleerd in kaart brengen van de [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] Het uiteindelijke doel is de ontwikkeling van therapieën die de cognitieve problemen (op het gebied van executief functioneren, leren, geheugen en besluitvorming) van schizofrenie patiënten verminderen. Het vermoeden bestaat dat de afname van witte stof in bepaalde hersengebieden van schizofrenie patiënten de cognitieve symptomen van deze ziekte veroorzaakt. Deze hypothese wordt door de aanvrager onderzocht op moleculair, cellulair en gedragsmatig niveau in een specifiek ratmodel voor deze ziekte. De resultaten van dit onderzoek kunnen leiden tot nieuwe therapie-mogelijkheden voor mensen met schizofrenie waardoor hun problemen op cognitief gebied zouden kunnen afnemen. De DEC is daarom van mening dat er binnen dit project een directe relatie is tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. Bovendien is de DEC van mening dat het doel van deze projectaanvraag gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.
Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).
Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun geestelijke gezondheid en kwaliteit van leven. Gerichte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een betere diagnostiek en behandeling met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt weer gezond wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor ernstige ziekten, zoals schizofrenie, is van groot belang voor de samenleving.
6. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geëvalueerd.
12. De integriteit van de dieren wordt enigszins aangetast door de selectieve fok. Op basis van de reactie op het toedienen van de dopamine agonist apomorfine worden dieren geselecteerd voor deze fok die er op gericht is ratten te verkrijgen die als model voor schizofrenie dienen. De zelfredzaamheid van deze dieren is hierdoor echter niet merkbaar aangetast.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring met de gebruikte rattenstammen ingeschat. De commissie is het dan ook eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Myelinisatie en de effecten daarvan op het gedrag kunnen alleen in proefdieren worden onderzocht. De invloed van middelen en van huisvestingsomstandigheden op die myelinisatie (en daarmee op het gedrag), kan alleen in hersenen van proefdieren worden onderzocht.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Waar mogelijk worden meerdere gedragstesten met hetzelfde dier uitgevoerd. Alle controlegroepen zijn nodig om wetenschappelijk betrouwbare uitspraken te kunnen doen.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De gekozen gedragstesten veroorzaken doorgaans niet meer dan licht ongerief. De langdurige individuele huisvesting van een deel van de dieren veroorzaakt matig ongerief, maar is noodzakelijk voor het behalen van de doelstelling. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager wil het onderzoek alleen bij mannelijke dieren uitvoeren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: Het is bekend dat cognitieve symptomen sterker zijn in mannelijke dan in vrouwelijke schizofreniepatiënten. De verschillen in myelinisatie in het gehanteerde diermodel voor schizofrenie zijn ook groter in mannelijke dieren dan in vrouwelijke dieren. Daarom zullen de experimenten alleen met mannelijke dieren worden gedaan. De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen met zo min mogelijk dieren te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren.

19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om hersenweefsel te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?

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

Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun geestelijke gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Schizofrenie is een ingrijpende ziekte die in 1% van de wereldwijde populatie optreedt. De huidige behandeling richt zich alleen op het verminderen van de zogenaamde positieve symptomen (zoals hallucinaties), terwijl ook de cognitieve symptomen (aantasting van het cognitief functioneren, moeite met leren, herinneren en beslissen) bijdragen aan de hoge ziektelast en een grote impact hebben op de zelfredzaamheid van de patiënt. De resultaten van dit project kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën die de cognitieve symptomen van schizofrenie verminderen. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het ontwikkelen van nieuwe aanvullende therapieën voor schizofrenie van substantieel belang.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het gedetailleerd in kaart brengen van de afwijkingen in de myelinisatie van de prefrontale cortex in een ratmodel voor schizofrenie, en onderzoeken of herstel van de myelinisatie leidt tot normalisatie van de resultaten van cognitieve gedragstesten met deze dieren. Het uiteindelijke doel is de ontwikkeling van

therapieën die de cognitieve problemen (op het gebied van executief functioneren, leren, geheugen en besluitvorming) van schizofrenie patiënten verminderen. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

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

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD103002017865

Datum 2 maart 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 10 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Myelination in schizophrenia: mechanisms and therapeutics" met aanvraagnummer AVD103002017865. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

In bijlage 3.4.4.1 beschrijft u dat er embryo's worden verzameld. Op welk moment in de dracht worden deze verzameld? Pas vanaf het derde trimester van de dracht (dag E14) hoeven de dieren opgenomen te worden in het projectvoorstel.

Op bladzijde 27 van de DAP, bijlage 3.4.4.3 beschrijft u in de eerste alinea bij de farmacologische interventies dat u voor de pilots om een dose response curve te maken slechts 1 sex en 1 leeftijd gebruikt. Uit de berekening van het aantal dieren die er net voorstaat rekent u wel met 2 leeftijden en komt u op n=72 ratten. Dit lijkt met elkaar in tegenspraak.

Bij de pilot voor het maken van een dose response curve voor interventie met antioxidanten komt u wel op n=36 dieren voor de pilot.

Kunt u in bijlage 3.4.4.4 bij K. de ongeriefclassificatie de dieren uitsplitsen

naar aantal en percentage dieren dat Licht dan wel Matig ongerief zal ondervinden?

Wanneer er dieraantallen of ongeriefclassificatie wijzigen naar aanleiding van uw aanvullingen, kunt u dan ook de Niet technische Samenvatting aanpassen?

Datum:
2 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017865

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

Antwoorden ivm aanvraag projectvergunning Dierproeven getiteld "Myelination in schizophrenia: mechanisms and therapeutics" (aanvraagnummer AVD103002017865)

In de nieuwe versie van onze projectaanvraag zijn veranderingen in het groen aangegeven. Hieronder kunt u de antwoorden vinden op alle vragen die aan ons gesteld zijn.

Onduidelijkheden:

- “In bijlage 3.4.4.1 beschrijft u dat er embryo's worden verzameld. Op welk moment in de dracht worden deze verzameld? Pas vanaf het derde trimester van de dracht (dag E14) hoeven de dieren opgenomen te worden in het projectvoorstel.”

Antwoord: Recentelijke testen met het verzamelen van primaire cultures van oligodendrocyten hebben aangetoond dat dit celtype nog niet aanwezig is in de embryonale fase, maar pas rond de geboorte van de dieren wordt gevormd. Daarom passen wij dit aan naar dieren van 1-2 dagen oud. Zie voor textuele veranderingen DAP1; choice and justification of animals.

- “Op bladzijde 27 van de DAP, bijlage 3.4.4.3 beschrijft u in de eerste alinea bij de farmacologische interventies dat u voor de pilots om een dose response curve te maken slechts 1 sex en 1 leeftijd gebruikt. Uit de berekening van het aantal dieren die er net voorstaat rekent u wel met 2 leeftijden en komt u op n=72 ratten. Dit lijkt met elkaar in tegenspraak. Bij de pilot voor het maken van een dose response curve voor interventie met antioxidanten komt u wel op n=36 dieren voor de pilot.”

Antwoord: De farmacologische interventie met [REDACTED] zullen wij doen op 2 verschillende leeftijden, omdat leeftijd de effectieve dosis van een stof kan beïnvloeden (Echeverria, Siber et al. 1975, d'Hollander, Massaux et al. 1982). Daarom zou een dose-response curve die gemaakt is met gebruik van jonge dieren, niet toepasbaar zijn op experimenten die met volwassen dieren worden gedaan en omgekeerd. Daarom willen wij voor de [REDACTED] stoffen graag op 2 leeftijden een dose-response curve maken, zodat wij op beide leeftijden de effectieve dosis kunnen bepalen en een optimaal experiment kunnen uitvoeren.

De farmacologische interventie met [REDACTED] willen wij doen op dieren van 1 leeftijdscategorie, omdat het gebruik van [REDACTED] alleen een preventief effect zou kunnen hebben. Het testen van de effectieve dosis hoeft daarom ook alleen op de leeftijd gedaan te worden, waarop wij de experimenten willen uitvoeren. In dit geval is dat dus slechts 1 leeftijd en daarom willen wij graag een dose-response curve met dieren van 1 leeftijd maken voor de interventie met [REDACTED].

Dit is nu verduidelijkt in de aanvraag, deze veranderingen kunnen worden gevonden in DAP3; choice and justification of animals.

- “Kunt u in bijlage 3.4.4.4 bij K. de ongeriefclassificatie de dieren uitsplitsen naar aantal en percentage dieren dat Licht dan wel Matig ongerief zal ondervinden?”

Antwoord: Dit is nu aangepast in de aanvraag; veranderingen kunnen worden gevonden in sectie K van DAP4.

- “Wanneer er dieraantallen of ongeriefclassificatie wijzigen naar aanleiding van uw aanvullingen, kunt u dan ook de Niet technische Samenvatting aanpassen?”

Antwoord: Er zijn geen dieraantallen of ongeriefclassificaties veranderd.

Leges

De leges zijn nu voldaan.

Referenties

- d'Hollander, A., F. Massaux, M. Nevelsteen and S. Agoston (1982). "Age-dependent dose-response relationship of ORG NC 45 in anaesthetized patients." Br J Anaesth **54**(6): 653-657.
- Echeverria, P., G. R. Siber, J. Paisley, A. L. Smith, D. H. Smith, N. Jaffe and D. Paed (1975). "Age-dependent dose response to gentamicin." J Pediatr **87**(5): 805-808.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

██████████ ██████████

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD103002017865
Bijlagen
1

Datum 17 maart 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████,

Op 10 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Myelination in schizofrenia: mechanisms and therapeutics" met aanvraagnummer AVD103002017865. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 8 maart 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Wij hebben gevraagd of u de leeftijd van de rattenpups kunt aangeven, het aantal dieren in bijlage 3.4.4.3 meer kunt onderbouwen en de ongeriefclassificatie voor de dieren in bijlage 3.4.4.4 procentueel kunt uitsplitsen. U heeft de vragen beantwoord en op basis daarvan de bijlagen dierproeven 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.

Deze specifieke voorwaarde volgt uit de wijze waarop u het project heeft beschreven. Met duidelijk gedefinieerde go/no go momenten waardoor het uiteindelijk mogelijk is dat u minder dan de helft van het aantal aangevraagde dieren op dit project inzet. Dit is ook opgenomen in de aangeleverde NTS. Deze dieren die niet gebruikt worden vanwege een no go in het project mogen niet voor andere doeleinden worden ingezet. In de aanvraag zijn de stoffen die u wilt gaan testen beschreven met een onderbouwing waarom u verwacht dat deze een effect kunnen hebben in het door u beschreven diermodel. Voor het

testen van andere stoffen ontbreekt deze onderbouwing.

Datum:
17 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017865

U kunt met uw project "Myelination in schizophrenia: mechanisms and therapeutics" starten. De vergunning wordt afgegeven van 16 maart 2017 tot en met 10 maart 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 9 februari 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).

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



H. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
17 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017865



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres: Postbus 9101

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 17 maart 2017 tot en met 10 maart 2022, voor het project "Myelination in schizophrenia: mechanisms and therapeutics" met aanvraagnummer AVD103002017865, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies. Er worden aanvullende voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is Instantievoor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 10 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 10 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 9 februari 2017, ontvangen op 10 februari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 8 maart 2017

Aanvraagnummer:
AVD103002017865

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|------------------------------|-------------|
| 3.4.4.1 Characterization: Molecular / Cellular / Structural | | | | |
| | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / verschillende leeftijden, zie bijlage 3.4.4.1 | 438 | 100% Licht | |
| 3.4.4.2 Characterization: Behaviour | | | | |
| | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / volwassen [REDACTED] en [REDACTED] ratten | 120 | 100% Licht | |
| 3.4.4.3 Pharmacological manipulation | | | | |
| | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / [REDACTED] en [REDACTED] ratten | 2.760 | 100% Licht | |
| 3.4.4.4 Behavioural manipulation | | | | |
| | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / [REDACTED] en [REDACTED] 28 dagen oud en volwassen | 420 | 14% Matig 84% Licht | |

Voorwaarden

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

Algemene voorwaarden

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:

AVD103002017865

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.

Specifieke voorwaarde

Deze vergunning is alleen geldig voor het aantal in het projectvoorstel genoemde teststoffen. Wanneer u andere stoffen gaat testen, moet u dit middels een wijziging aanvragen bij de CCD, ook als het totaal aantal dieren van de vergunning niet wordt overschreden door go / no go momenten. Voor nieuwe stoffen kunt u middels een wijziging een onderbouwing indienen.



Aanvraagnummer:

AVD103002017865

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:

AVD103002017865

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

| Inventaris Wob-verzoek W17-08 | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|---------------------------------------------|----------------|-----------------|--------|-------|--------|-------------------|--------|------|--|
| | | | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | |
| nr. | document NTS 2017872 | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 | |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | x | | |
| 2 | NTS | x | | | | | | | | |
| 3 | Projectvoorstel | | | | x | x | x | x | | |
| 4 | Bijlage | | | | x | x | x | x | | |
| 5 | Ontvangstbevestiging en factuur | | | | x | | x | x | | |
| 6 | Verzoek om aanvullende informatie DEC | | | | x | | x | x | | |
| 7 | Verzoek om aanvullende informatie aanvrager | | | | x | | x | x | | |
| 8 | Antwoord DEC | | | | x | | x | x | | |
| 9 | Antwoord aanvrager | | | | x | | x | x | | |
| 10 | DEC-Advies | | | | x | | x | x | | |
| 11 | Advies CCD | | x | | | | | | x | |
| 12 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | | |



1.

22 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.zbo-ccd.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 10300
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

| | |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Naam instelling of organisatie | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | Instantie voor dierenwelzijn |
| KvK-nummer | 4 1 0 5 5 6 2 9 |
| Straat en huisnummer | Geert Groteplein 10 |
| Postbus | 9101, [redacted] |
| Postcode en plaats | 6500HB Nijmegen |
| IBAN | NL90ABNA0231209983 |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer | UMC St Radboud |

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

| | | |
|-----------------------------|------------|-----------------------------------------------------------------------|
| (Titel) Naam en voorletters | [redacted] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | [redacted] | |
| Afdeling | [redacted] | |
| Telefoonnummer | [redacted] | |
| E-mailadres | [redacted] | |

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

| | | |
|-----------------------------|------------|-----------------------------------------------------------------------|
| (Titel) Naam en voorletters | [redacted] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | [redacted] | |
| Afdeling | [redacted] | |
| Telefoonnummer | [redacted] | |
| E-mailadres | [redacted] | |

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

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het 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 | 17 . 03 . 2017 |
| Einddatum | 17 . 03 . 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Comorbiditeit tussen depressie en cocaine verslaving: de rol van de habenula
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------------------------------|
| Naam DEC | RU DEC |
| Postadres | Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [Redacted] |
| E-mailadres | [Redacted] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.035,00 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
- DEC-advies en factuurinformatie

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 1.6). 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 Nijmegen

Datum 17 - 02 - 2017

Handtekening [REDACTED]

**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'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula |

2 Categories

| | | |
|-----|-----------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research <input type="checkbox"/> Translational or applied research <input type="checkbox"/> Regulatory use 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.
-

Drug addiction and depression are major psychiatric disorders associated with a tremendous burden for those who are inflicted, including families, as well as society. According to the World Health Organization, these disorders are among the Top 3 (depression) and Top 10 (drug addiction) of most burdensome disorders and cost the society 179 billion Euros (Olesen et al. 2012). A hallmark of drug addiction is compulsive drug intake as an attempt to increase the brain's reward's levels, while depression is characterized by a negative mood and a low reward state. Intriguingly, the two psychiatric conditions are highly comorbid. 35-50% (Conner et al. 2008, Leventhal et al. 2008, Reissner et al. 2012) of all drug addicts are also depressed, but nobody knows why. Are drugs used to decrease depressive feelings, or do drugs trigger a negative emotional state? An alternative thought is that the intensity, rather than the value, of stimuli matters. That is, if emotions are flat, neither depression nor drug addiction may occur. As depressed patients are highly sensitive to stressors and drug addicts are highly sensitive to drugs of abuse, the two seemingly 'opposing' psychiatric conditions may share a common neural substrate. Since responsivity to environmental stimuli, being of negative or positive value, is essential for survival of a species (e.g. escaping from threat and obtaining food, resp.) it is likely that an ancient part of the brain is implicated in signaling the intensity of stimuli. One intriguing candidate is the habenula. The habenula is a small nucleus located beneath the hippocampus, and receives input from the septum, striatum, thalamus and pallium (see figure 1).

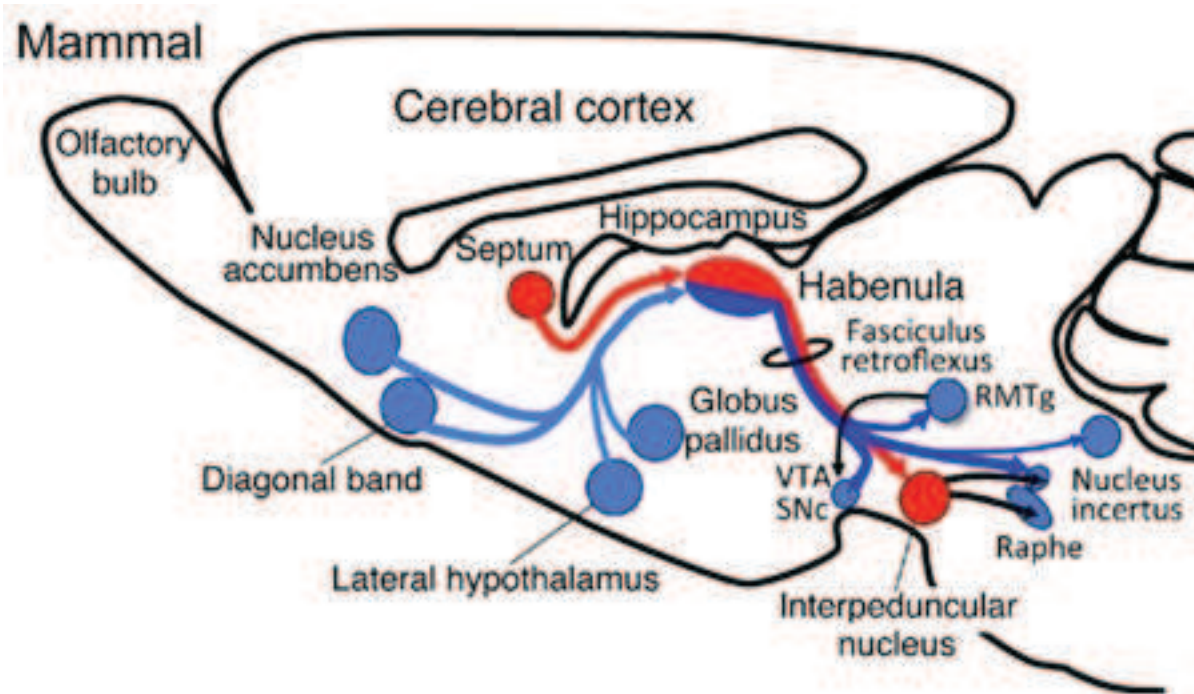


Figure 1. The position of the habenula in the rodent brain

The habenula can be divided into two parts: the lateral habenula (LHb) and the medial habenula (MHb). The subregions differ functionally through distinctive outputs. Specifically, the lateral habenula (LHb) sends glutamatergic projection neurons to the rostromedial tegmental nucleus (RMTg) region, which consists of inhibitory GABAergic neurons (Ren et al. 2011). The rostromedial tegmental nucleus (RMTg) on its turn projects to the ventral tegmental area (VTA), where dopaminergic neurons are located (signaling reward prediction errors), and medial/dorsal Raphe nuclei (MRN/DRN), where serotonergic neurons (predicting punishment) are located. Lateral habenula (LHb) mediated activation of inhibitory neurons in the rostromedial tegmental nucleus (RMTg) leads to inhibition of the ventral tegmental area (VTA) and raphe nuclei. The lateral habenula (LHb) also projects directly to the ventral tegmental area (VTA) and raphe nuclei. The Medial habenula (MHb) projects by glutamatergic afferents to the interpeduncular nucleus (IPN) (Viswanath et al. 2013). The interpeduncular nucleus (IPN) sends its GABAergic inhibitory projection to the ventral tegmental area (VTA) and raphe nuclei. These lateral habenula (LHb) and medial habenula (MHb) efferents run through the fasciculus retroflexus (see figure 1 and 2). Hence, the habenula can simultaneously inhibit and stimulate dopamine and serotonin signaling, and thereby regulate the intensity of the stimuli, regardless whether they signal reward or punishment.

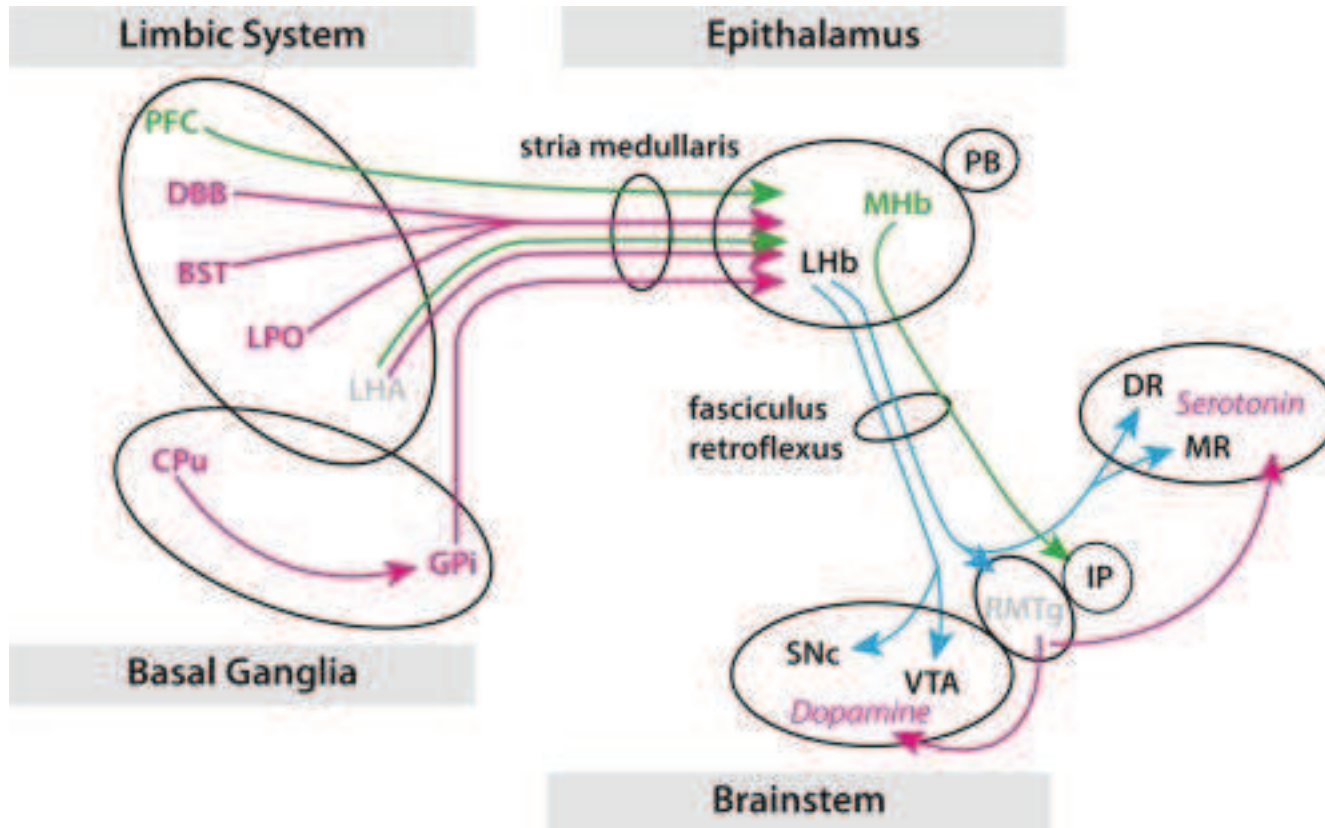


Figure 2. Habenula anatomical connections

In a delay reward discounting task, it was found that disruption of lateral habenula (LHb) signal outflow rendered animals indifferent to both the larger/uncertain reward and the smaller/certain reward. The animals responded for both options at random (Orsini et al. 2015). This observation suggests that the lateral habenula (LHb) signals the intensity of sensory stimuli per se, being either positive or negative, and thereby mediates decision making processes. Without stimulus perception, decision making is disrupted.

Drugs of abuse disturb the activity of the lateral habenula (LHb). Cocaine exposure and cocaine-related cues increase c-Fos expression in the lateral habenula (LHb), implying that the drug and drug predicting cues increase lateral habenula (LHb) activity (Brown et al. 2010, James et al. 2011, Mahler et al. 2012). In mouse lateral habenula (LHb) neurons targeting the rostromedial tegmental nucleus (RMTg), cocaine enhanced glutamatergic transmission (Meye et al. 2015). Preventing this mechanism also prevented depressive-like symptoms during withdrawal from repeated cocaine administration (Meye et al. 2015). If signals coming out of the lateral habenula (LHb) are toxically amplified after cocaine exposure, ventral tegmental area (VTA) dopamine neurons and raphe serotonin neurons receive a greater amount of toxic inhibition from the rostromedial tegmental

nucleus (RMTg), causing less dopamine and potentially also less serotonin to be released in reward-related and emotion-related regions, leading to a reduction of positive and negative affect. On the long-term, when drugs are used for a substantial period of time, the increased excitability of lateral habenula (LHb) glutamatergic efferents may lead to dysfunction of the fasciculus retroflexus. It has been reported that drug addicts and rats with a history of cocaine self-administration are characterized by degeneration of the fasciculus retroflexus (Lipton et al. 1991, Ellison 2002, Lax et al. 2013). In rats this was reflected by a decreased number of lateral habenula (LHb) neurons labeled with a retrograde tracer injected into the ventral tegmental area (VTA) (Lax et al. 2013).

Regarding negative affect, it was found that learned helplessness in rats, a behavioral phenotype of depression, was associated with increased metabolic activity in the lateral habenula (LHb) (Shumake et al. 2003). Stamatakis and Stuber (Stamatakis et al. 2012) found that footshock exposure, used to induced depressive-like phenotypes in rodents, enhances activity of lateral habenula (LHb) neurons projecting to the rostromedial tegmental nucleus (RMTg). Additionally, activating these projections induced passive avoidance and conditioned place aversion. Vice versa, inhibition of the lateral habenula (LHb) using the DREADD (Designer Receptor Exclusively Activated by Designer Drugs) technology led to an anti-depressive state in the forced swim test (Nair et al. 2013). Likewise, Yang and colleagues (Yang et al. 2008) found that rats with electrolytic lesions of the lateral habenula (LHb) demonstrated a decrease in immobility time and an increase in climbing time in the forced swim test, indicative for decreased depressive-like behavior. The findings of the drug addiction and depression studies combined suggest that reward and depressive mood are mediated through comparable neural mechanisms.

The findings above seem to provide the coherent view that drugs of abuse and stressors activate the lateral habenula (LHb) and thereby decrease the activity of ventral tegmental area (VTA) dopamine neurons and potentially Raphe serotonin leading to reward craving (to compensate a reward deficit) and a negative emotional state (due to a reward deficit and/or increased sensitivity to punishment). However, not all individuals using drugs or exposed to stress unequivocally develop drug addiction and depression. There are large individual differences in vulnerability to these brain disorders. Vulnerability to drug addiction and depression is, at least in part, mediated by genotype. There is ample evidence that the low activity short allelic variant of the serotonin transporter polymorphism in humans (5-HTTLPR s-allele) increases risk for depression (Karg et al. 2011) and drug addiction (Gerra et al. 2007, Martín-Santos et al. 2010, Enoch 2011). Rats lacking the serotonin transporter (5-HTT), which mimic the 5-HTTLPR s-allele (Caspi et al. 2010), show both heightened depressive-like symptoms ([REDACTED] and increased regular (not addictive) and compulsive ('addictive') cocaine self-administration [REDACTED] see figure 3). Hence, inherited 5-HTT down-regulation increases vulnerability to both drug addiction and depression, implying that the 5-HTT influences stimulus intensity. This is confirmed by research reports, meta-analyses and narrative reviews showing that 5-HTT gene variance in humans is associated with sensitivity to both aversive and rewarding stimuli (Belsky et al. 2009, Beevers et al. 2010, Mitchell et al. 2011, van Ijzendoorn et al. 2012). Since the serotonin system is the most ancient among all neurotransmitters and plays a key role in neurodevelopment (Gaspar et al. 2003, Homberg et al. 2010, [REDACTED]), it likely affects the wiring of the habenula. [REDACTED]



Figure 3. [Redacted text]



Figure 4. 

Glossary for terms used throughout the application:

5-HTT: serotonin transporter

5-HTT^{-/-}: knockout for the serotonin transporter

CAMKII: marker of glutamatergic neurons

Cre: recombinase enzyme

DRN: dorsal raphe nucleus

DREADD: Designer Receptor exclusively activated by designer drugs.

GAD67: marker of GABAergic neurons

Vglut 1-3: vesicular glutamate transporter, marks glutamatergic neurons

TpH2: Tryptophan hydroxylase 2, marks serotonergic neurons

TH: Tyrosine hydroxylase, marks dopaminergic neurons

c-fos: immediate early gene.

ΔFosB: critical factor in the development of drug addictions.

5-HT: Serotonin

hM3Dq and hM4Di: DREADD receptors

IP: interpeduncular nucleus Lhb: lateral habenula

MHb: medial habenula

MRN: median raphe nucleus

RMTg: rostromedial tegmental nucleus

VTA: ventral tegmental area

ShA: short access, 1 hr cocaine self-administration per day

LgA: long access, 6 hrs cocaine self-administration sessions per day

References

Beevers, C. G., J. Pacheco, P. Clasen, J. E. McGeary and D. Schnyer (2010). "Prefrontal morphology, 5-HTTLPR polymorphism and biased attention for emotional stimuli." *Genes, Brain and Behavior* 9(2): 224-233.

Belsky, J., C. Jonassaint, M. Pluess, M. Stanton, B. Brummett and R. Williams (2009). "Vulnerability genes or plasticity genes?" *Molecular psychiatry* 14(8): 746-754.

Brown, R. M., J. L. Short and A. J. Lawrence (2010). "Identification of brain nuclei implicated in cocaine-primed reinstatement of conditioned place preference: a behaviour dissociable from sensitization." *PLoS One* 5(12): e15889.

Caspi, A., A. R. Hariri, A. Holmes, R. Uher and T. E. Moffitt (2010). "Genetic Sensitivity to the Environment: The Case of the Serotonin Transporter Gene and Its Implications for Studying Complex Diseases and Traits." *FOCUS* 8(3): 398-416.

Conner, K. R., M. Piquart and A. P. Holbrook (2008). "Meta-analysis of depression and substance use and impairment among cocaine users." *Drug and Alcohol Dependence* 98(1-2): 13-23.

Ellison, G. (2002). "Neural degeneration following chronic stimulant abuse reveals a weak link in brain, fasciculus retroflexus, implying the loss of forebrain control circuitry." European neuropsychopharmacology 12(4): 287-297.

Enoch, M.-A. (2011). "The role of early life stress as a predictor for alcohol and drug dependence." Psychopharmacology 214(1): 17-31.

Gaspar, P., O. Cases and L. Maroteaux (2003). "The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics." Nat Rev Neurosci 4(12): 1002-1012.

Gerra, G., A. Zaimovic, L. Garofano, F. Ciusa, G. Moi, P. Avanzini, E. Talarico, F. Gardini, F. Brambilla, M. Manfredini and C. Donnini (2007). "Perceived parenting behavior in the childhood of cocaine users: relationship with genotype and personality traits." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 144B(1): 52-57.

[REDACTED]

James, M. H., J. L. Charnley, J. R. Flynn, D. W. Smith and C. V. Dayas (2011). "Propensity to 'relapse' following exposure to cocaine cues is associated with the recruitment of specific thalamic and epithalamic nuclei." Neuroscience 199: 235-242.

Karg, K., M. Burmeister, K. Shedden and S. Sen (2011). "The serotonin transporter promoter variant (5-HTTLPR), stress, and depression meta-analysis revisited: Evidence of genetic moderation." Archives of General Psychiatry 68(5): 444-454.

Lax, E., A. Friedman, O. Croitoru, E. Sudai, H. Ben-Moshe, L. Redlus, E. Sasson, T. Blumenfeld-Katzir, Y. Assaf and G. Yadid (2013). "Neurodegeneration of lateral habenula efferent fibers after intermittent cocaine administration: implications for deep brain stimulation." Neuropharmacology 75: 246-254.

Leventhal, A. M., C. F. Witt and M. Zimmerman (2008). "Associations between depression subtypes and substance use disorders." Psychiatry Research 161(1): 43-50.

Lipton, J., S. Zeigler, J. Wilkins and G. Ellison (1991). "A silicone pellet for continuous cocaine: comparison with continuous amphetamine." Pharmacology Biochemistry and Behavior 38(4): 927-930.

Mahler, S. V. and G. S. Aston-Jones (2012). "Fos activation of selective afferents to ventral tegmental area during cue-induced reinstatement of cocaine seeking in rats." The Journal of Neuroscience 32(38): 13309-13325.

Martín-Santos, R., M. Torrens, S. Poudevida, K. Langohr, E. Cuyás, R. Pacifici, M. Farré, S. Pichini and R. De La Torre (2010). "GENETIC STUDY: 5-HTTLPR polymorphism, mood disorders and MDMA use in a 3-year follow-up study." Addiction Biology 15(1): 15-22.

Meye, F. J., K. Valentinova, S. Lecca, L. Marion-Poll, M. J. Maroteaux, S. Musardo, I. Moutkine, F. Gardoni, R. L. Haganir, F. Georges and M. Mameli (2015). "Cocaine-evoked negative symptoms require AMPA receptor trafficking in the lateral habenula." Nat Neurosci 18(3): 376-378.

Mitchell, C., D. Notterman, J. Brooks-Gunn, J. Hobcraft, I. Garfinkel, K. Jaeger, I. Kotenko and S. McLanahan (2011). "Role of mother's genes and environment in postpartum depression." Proc Natl Acad Sci U S A 108(20): 8189-8193.

Nair, S. G., N. S. Strand and J. F. Neumaier (2013). "DREADDing the lateral habenula: a review of methodological approaches for studying lateral habenula function." Brain Res 1511: 93-101.

[REDACTED]

Olesen, J., A. Gustavsson, M. Svensson, H. U. Wittchen, B. Jonsson, C. s. group and C. European Brain (2012). "The economic cost of brain disorders in Europe." Eur J Neurol 19(1): 155-162.

[REDACTED]
Neuroscience 152(3): 573-584.

Orsini, C. A., D. E. Moorman, J. W. Young, B. Setlow and S. B. Floresco (2015). "Neural mechanisms regulating different forms of risk-related decision-making: Insights from animal models." Neurosci Biobehav Rev 58: 147-167.

Reissner, V., A. Kokkevi, F. Schifano, R. Room, J. Storbjork, R. Stohler, L. DiFuria, J. Rehm, M. Geyer, F. Holscher and N. Scherbaum (2012). "Differences in drug consumption, comorbidity and health service use of opioid addicts across six European urban regions (TREAT-project)." European Psychiatry 27(6): 455-462.

Ren, J., C. Qin, F. Hu, J. Tan, L. Qiu, S. Zhao, G. Feng and M. Luo (2011). "Habenula "cholinergic" neurons co-release glutamate and acetylcholine and activate postsynaptic neurons via distinct transmission modes." Neuron 69(3): 445-452.

Shumake, J., E. Edwards and F. Gonzalez-Lima (2003). "Opposite metabolic changes in the habenula and ventral tegmental area of a genetic model of helpless behavior." Brain Res 963(1-2): 274-281.

Stamatakis, A. M. and G. D. Stuber (2012). "Activation of lateral habenula inputs to the ventral midbrain promotes behavioral avoidance." Nature neuroscience 15(8): 1105-1107.

van Ijzendoorn, M. H., J. Belsky and M. J. Bakermans-Kranenburg (2012). "Serotonin transporter genotype 5HTTLPR as a marker of differential susceptibility? A meta-analysis of child and adolescent gene-by-environment studies." Transl Psychiatry 2: e147.

Viswanath, H., A. Q. Carter, P. R. Baldwin, D. L. Molfese and R. Salas (2013). "The medial habenula: still neglected." Front Hum Neurosci 7: 931.

[REDACTED]
Yang, L. M., B. Hu, Y. H. Xia, B. L. Zhang and H. Zhao (2008). "Lateral habenula lesions improve the behavioral response in depressed rats via increasing the serotonin level in dorsal raphe nucleus." Behav Brain Res 188(1): 84-90.

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?

To advance the understanding of the role of the lateral habenula (LHb) in the comorbidity between drug addiction and depression, we aim to test the hypothesis that the comorbidity between drug addiction and depression is mediated by 5-HTT genotype-dependent enhanced lateral habenula (LHb) activity, leading to increased ventral tegmental area (VTA) inhibition and a strong reward deficit, and potentially also increased Raphe inhibition and increased punishment sensitivity.

Objectives:

To define the activity, neuronal profile and connectivity of the neurocircuitry involving the lateral habenula (LHb), rostromedial tegmental nucleus (RMTg), ventral tegmental area (VTA) and raphe nuclei under depressive-like conditions and during regular and compulsive cocaine self-administration, as function of serotonin transporter genotype.

Our lab has the needed experience and facilities in-house to perform these studies. Our group is expert in behavioral studies of knock-out animals and expert in depression-like measures and cocaine self-administration. [REDACTED]

[REDACTED] We also have experience with ex vivo immunohistochemistry. The measurement of neural connectivity and its manipulation is new to us. Yet, we do master the basis of the techniques, such as stereotactic surgeries and intracerebral infusion of drugs/viral vectors. The challenge involves the choice for the proper viral vectors and their injection in the appropriate brain region. [REDACTED]

[REDACTED] In sum, our experience with behavioral and histochemical measurements in rats, together with the availability of the required equipment and the expertise of how to apply these, as well as a network of colleagues with relevant expertise, provides high feasibility of this project.

3.3 Relevance

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

According to the World Health Organization, depression disorder is among the Top 3 and drug addiction is Top 10 of most burdensome disorders and cost the society 179 billion Euros (Olesen et al. 2012). The two psychiatric conditions are highly comorbid. 35-50% (Conner et al. 2008, Leventhal et al. 2008, Reissner et al. 2012) of all drug addicts are also depressed, but nobody knows why. Basic understanding of the involvement of serotonin transporter in the comorbidity of depression and drug addiction can ultimately be back-translated into treatment adjustments in follow-up studies, and potentially prevention approaches, in a personalized manner. This is essential, because besides that there is no pharmacotherapy available for the treatment of cocaine addiction, comorbidity in drug addiction is even more difficult to treat. On the long-term, this research can facilitate the development of novel treatments for patients with depression-addiction comorbidity, such as deep brain stimulation targeting the habenula.

References

Conner, K. R., M. Piquart and A. P. Holbrook (2008). "Meta-analysis of depression and substance use and impairment among cocaine users." Drug and Alcohol Dependence 98(1-2): 13-23.

Leventhal, A. M., C. F. Witt and M. Zimmerman (2008). "Associations between depression subtypes and substance use disorders." Psychiatry Research 161(1): 43-50.

Olesen, J., A. Gustavsson, M. Svensson, H. U. Wittchen, B. Jonsson, C. s. group and C. European Brain (2012). "The economic cost of brain disorders in Europe." Eur J Neurol 19(1): 155-162.

Reissner, V., A. Kokkevi, F. Schifano, R. Room, J. Storbjork, R. Stohler, L. DiFuria, J. Rehm, M. Geyer, F. Holscher and N. Scherbaum (2012). "Differences in drug consumption, comorbidity and health service use of opioid addicts across six European urban regions (TREAT-project)." European Psychiatry 27(6): 455-462.

3.4 Research Strategy

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

The overall aim of this research project is to elucidate the activity and neuronal profile of the neurocircuitry involving the LHB under depressive-like conditions and during regular and compulsive cocaine self-administration, as function of serotonin transporter genotype.

We employ two drug self-administration regimes: Short access cocaine self-administration allows the measurement of regular drug self-administration and long access cocaine self-administration allows the measurement of compulsive cocaine self-administration. The transition from regular to compulsive cocaine self-administration is associated with a change in emotional state, like the emergence of depression. We want to investigate the addiction process, from regular to compulsive drug self-administration. Either alone is insufficiently informative, because regular drug self-administration is not yet addictive behaviour, and compulsive self-administration is dependent on the establishment of regular drug self-administration. For this reason, we have designed the following experiments.

Pilot study: For the experiment 1a below rats have to be equipped with an intravenous catheter and for experiment 1d the animals additionally will undergo a stereotactic surgery. These two surgeries need to be trained; specifically the finding of the proper coordinates for infusing tracers into the rostral tegmental area, VTA or raphe nuclei is challenging. The pilot study serves these two purposes.

1. Experiment 1a. Depressive-like behavior and cocaine self-administration in wild-type and serotonin transporter knockout (5-HTT^{-/-}) rats. First we study depression-like behaviour (ambiguous cue interpretation test) preceding cocaine self-administration, and then during withdrawal from regular and compulsive cocaine self-administration. To assess regular and compulsive self-administration we use the short access and long access cocaine self-administration regimes, respectively. See figure 5.

2. Experiment 1b. Ex vivo glutamate and GABA, ΔFosB, c-Fos, 5-HT ect. markers in the habenula, rostromedial tegmental nucleus (RMTg), ventral tegmental area (VTA) and dorsal raphe nuclei (DRN) brain regions in wild-type and serotonin transporter knockout (5-HTT^{-/-}) rats. We study the neurocircuitry associated with depression-like behaviour before and during cocaine self-administration, and cocaine self-administration itself, using ex vivo immunohistochemistry. See figure 5.

3. Experiment 1c. Retrograde tracing combined with immunostaining in the lateral habenula (LHB)-rostromedial tegmental nucleus (RMTg)-ventral tegmental area (VTA)-dorsal raphe nuclei (DRN) circuit projections in wild-type and serotonin transporter knockout (5-HTT^{-/-}) rats. We study the neurocircuitry associated with depression-like behaviour before and during withdrawal from cocaine self-administration, and cocaine self-administration itself, using in vivo tracing. We use a general retrograde monosynaptic tracer. It traces the glutamatergic projection neuron back to the habenula. By double immunostaining it can be identified with type of neurons in the target areas (rostral tegmental area, VTA, raphe nuclei) contact the glutamatergic projection neurons. The region of tracer injection will be determined based on experiment 1b. See figure 5.

4. Experiment 1d. Retrograde tracing of circuit projections in wild-type and serotonin transporter knockout (5-HTT^{-/-}) rats crossed with CAMKII::Cre (Recombinase expression in glutamatergic neurons) or GAD67::Cre (Recombinase expression in GABAergic neurons) or TH::Cre (Recombinase expression in Dopaminergic neurons), or Tph2::Cre (Recombinase expression in Serotonergic neurons) transgenic rats. We study the neurocircuitry associated with depression-like behaviour before and during withdrawal from cocaine self-administration, and cocaine self-administration itself, using in vivo tracing in a cell-type specific manner. More specifically: LHB projection neurons are glutamatergic neurons, and they connect to GABAergic neurons in the rostral tegmental area, dopaminergic neurons in the VTA and serotonergic neurons in the raphe nuclei. They can also connect to glutamatergic neurons which are also found in all these brain regions. Here, we will investigate which of these neuronal cell types receiving glutamatergic input from the lateral habenula contributes to the behavioural changes observed in experiment 1a. We do this using a transsynaptic retrograde tracer, which infects the target glutamatergic, GABAergic, dopaminergic or serotonergic neuron and transfers the synapse and is taken up by the glutamatergic projection neuron from the habenula. The region of tracer injection and subsequent the cell-type specificity of the neural projection tracing will be determined based on experiment 1b and 1c. See figure 6.

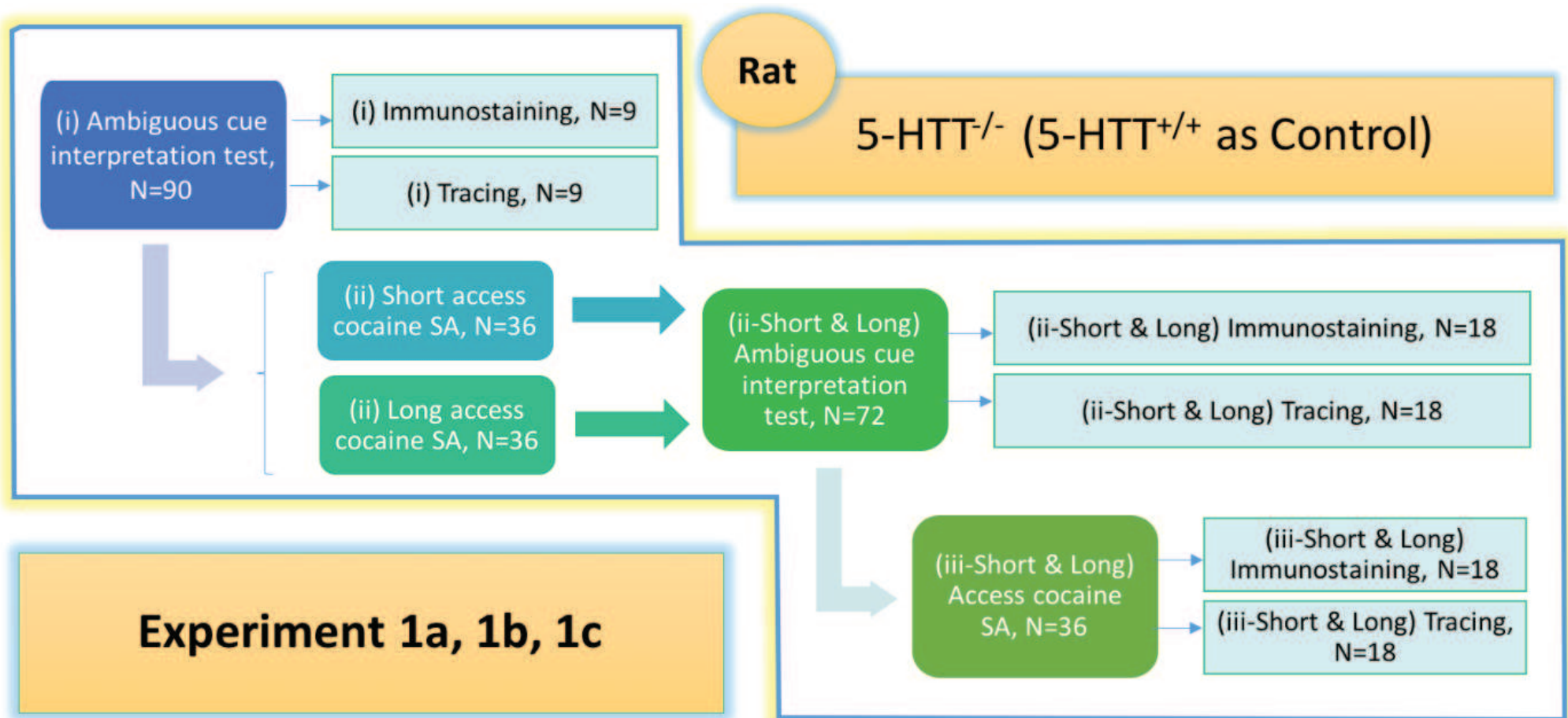


Figure 5. Outline of experiment 1a, 1b, 1c.

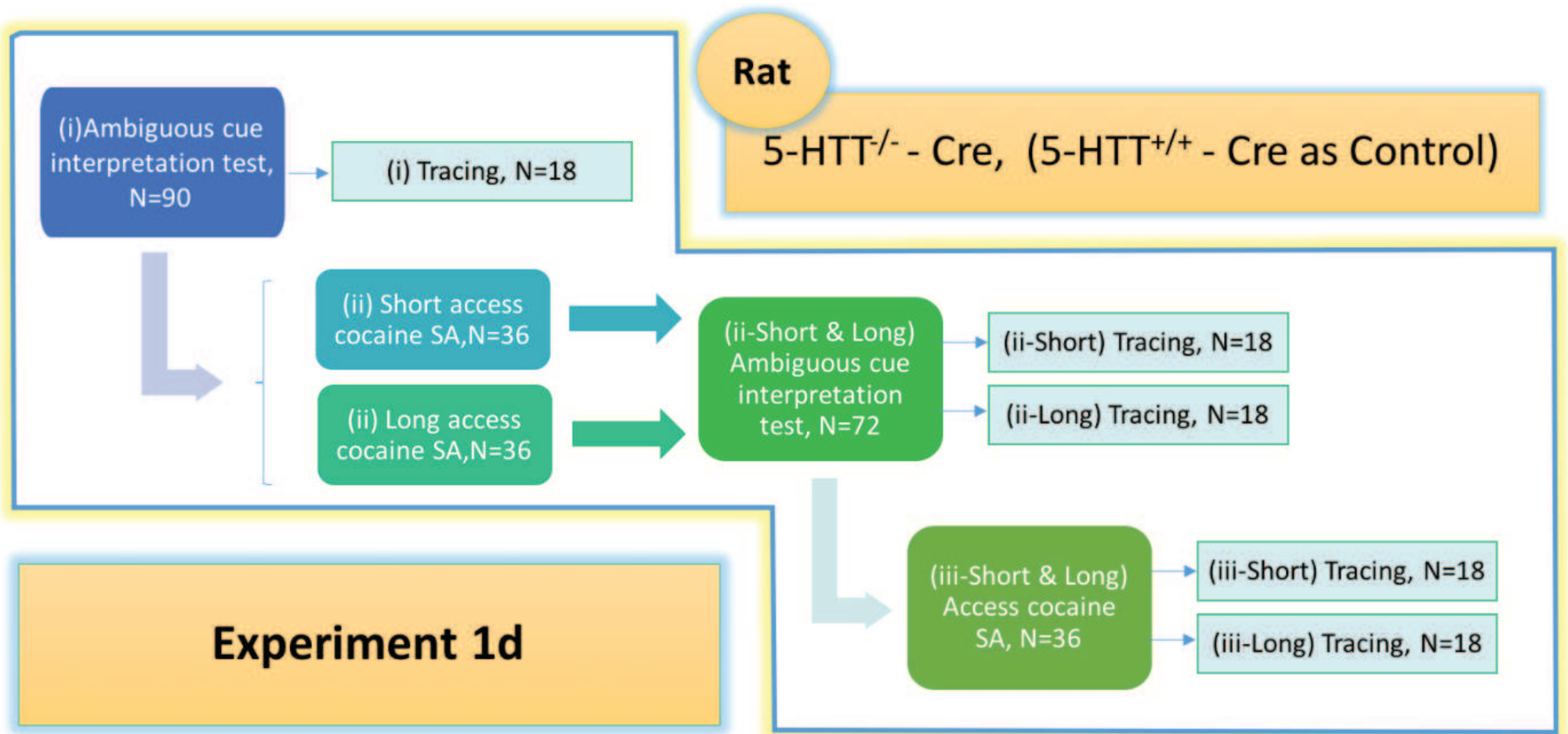


Figure 6. Outline of experiment 1d (cell-type specific tracing). Only one Cre rat and one projection area will be chosen to trace.

Go/no go decision point:

[REDACTED] We do make decisions for 1c and 1d, which are based on the outcome of experiment 1b. This is not a matter of finding a difference (we already have established that glutamatergic projection neurons are altered in serotonin transporter knockout rats, see figure 4), but a matter of what kind of difference. After experiment 1b, we will decide which brain area (connected to the lateral habenula) (experiment 1c) and which type of receiving neuron (experiment 1d) to focus on for the tracing study.

References

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.

To address our objectives, wild-type and 5-HTT knockout (5-HTT^{-/-}) rat will be used. As outlined in the background, this rat line models the human 5-HTTLPR s-allele linked to depression and drug addiction. [REDACTED]

[REDACTED] For experiment 1c, 5-HTT^{-/-} and wild-type rats will be crossed with either CAMKII::Cre or GAD67::Cre transgenic rats, in order to obtain double transgenics expressing either recombinase in CAMKII neurons (i.e. glutamatergic neurons) or recombinase in GAD67 neurons (i.e. GABAergic neurons). The type of Cre transgenic rats we use depends on the outcome of experiment 1b and 1c. The Cre rats will be obtained through a collaboration with prof. dr. Dusan Bartsch (Mannheim, Germany).

To assess depression-like behaviour we use the ambiguous cue interpretation test (Enkel et al. 2010). This test measures the interpretation bias of the animals, which is negative in case of depression. We use this test, as it is deemed to test the pessimism aspect of depression (Enkel et al. 2010). Furthermore, since the ambiguous cue interpretation test makes use of discrete cues, which we also present during the cocaine self-administration procedure, we are able to measure the carry-over effects of changes in interpretation bias to cocaine self-administration, and vice versa.

We use the intravenous cocaine self-administration paradigm because it is the best model to measure addictive behaviour in rats; rats self-administer the same drugs as humans do (Kalivas et al. 2005). We use the short (1 hour per day in the self-administration cage) and long access (6 hours per day in the self-administration cage) to measure regular and compulsive cocaine self-administration behaviour, respectively (Ahmed et al. 1998). Hereby we study the addiction process: from regular (not addictive) to compulsive (addictive) behaviour. Compulsivity will not happen without a stage of regular drug intake, and the inclusion of both stages in the study will help to properly interpret the findings. Depression can be a pre-existing state, or can be drug induced (or exacerbated by drug exposure). This will be elucidated in this study.

Feasibility:

We identify the changes in the lateral habenula (LHb)-rostromedial tegmental nucleus (RMTg)-ventral tegmental area (VTA)-dorsal raphe nuclei (DRN) circuit associated with depression, cocaine addiction, and their comorbidity using in vivo neuronal tracing allow us to get an overview of the circuitry and to identify regions of projections where alterations have taken place.

References

Ahmed, S. and G. Koob (1998). "Transition from moderate to excessive drug intake: change in hedonic set point." *Science* 282(5387): 298-300.
Enkel, T., D. Gholizadeh, O. v. B. und Halbach, C. Sanchis-Segura, R. Hurlemann, R. Spanagel, P. Gass and B. Vollmayr (2010). "Ambiguous-cue interpretation is biased under stress-and depression-like states in rats." *Neuropsychopharmacology* 35(4): 1008-1015.

[Redacted text]

Kalivas, P. W. and N. D. Volkow (2005). "The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice." *American Journal of Psychiatry* 162(8): 1403-1413.

[Redacted text]

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

In this study we will investigate the neural circuit function involving lateral habenula (LHb) in the comorbidity of depression and drug addiction as function of 5-HTT genotype. The experiments together address this aim. For this reason, depression-like and addictive behavior of the 5-HTT-/- rats and wild-type controls will be assessed first, followed by the measurement of the associated neural activity in the lateral habenula (LHb)-rostromedial tegmental nucleus (RMTg)-ventral tegmental area (VTA)-dorsal raphe nuclei (DRN). Next, we will assess the nature and structure of the connection of two regions within in the circuitry, and finally test/confirm the cell type of the connection.

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 | Behaviour and tracing |

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'. | 10300 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen | |
| 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 Behaviour and tracing |

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.

1 Experimental approach and primary outcome parameters

In the pilot study rats will be either intravenously equipped with a catheter or they will stereotactically receive a tracer injection into the rostral tegmental area, VTA or dorsal raphe nucleus. The surgery for the intravenous catheter implantation is terminal. The rats that will undergo the stereotactic surgery will recover from the surgery and sacrificed two-four weeks later. This is needed to determine, besides the location of the injection site, whether the tracer can be visualized in the habenula within two-four weeks and thus whether the tracing method works.

In experiment 1a, rats will be implanted with an intravenous catheter in the jugular vein. The rats are trained in the ambiguous cue interpretation test for depression, measuring pessimism versus optimism (**stage i**). After the ambiguous cue interpretation test the rats will be allowed access to cocaine, using self-administration cages. The animals will be withdrawn from cocaine self-administration and 24-72 hrs later they will be tested for depressive-like behaviour in the ambiguous cue interpretation test (**stage ii**). Thereafter the animals will be allowed to resume cocaine self-administration for 6 fixed ratio 1 (FR1) sessions of 6 hrs, after followed by decapitation (**stage iii**). Combining the results of the suggested experiments we aim to test whether there are differences in depression before or after cocaine self-administration and which comes first.

In experiment 1b, half of the rats tested in experiment 1a from **stages (i), (ii) and (iii)** are transcardially perfused with 4% paraformaldehyde. Using immunohistochemistry we test changes in protein expression in habenula neurons and its projected areas associated with both drug addiction and depression mood

In experiment 1c, the other half of rats from **stages (i), (ii) and (iii)** tested in experiment 1a will be used for in vivo tracing. By using a classical non-cell-type specific method to trace neurons, we will define which areas of the neurons projected to by fluorescent immunostainings.

In experiment 1d, In order to focus our findings in experiment 1c, we will apply a cell-type specific rabies virus tracing to define the specific neuronal projection. Based on data derived from experiment 1b and 1c we make a considered choice for using either CAMKII::Cre or GAD67::Cre rats, TH::Cre or TpH2::Cre rats to target a specific cell type, and one stage and one projection.

General information is included as follow:

Experiment

primary outcome parameters

1a addiction and depression behavioural tests

Identifying differences of depression-like behaviour (interpretation bias) before cocaine self-administration and during withdrawal from short/long access cocaine self-administration

Assessing the amount of cocaine intake under short and long access cocaine self-administration conditions.

1b Immunostaining

Mapping protein expression changes in the Lhb-RMtg-VTA-DRN circuit in serotonin transporter and wild-type rats in association with behavioural conditions measured under 1a.

1c non-cell-type specific tracing

Identifying which areas targeted by efferent projections from the habenula are altered in serotonin transporter and wild-type rats in association with behavioural conditions measured under 1a.

1d cell-type specific tracing

Characterizing the cell-type specific efferent projection neurons from the habenula to target areas in serotonin transporter and wild-type rats in association with behavioural conditions measured under 1a.

Justification

Self-administration is the most used technique to measure the intake of drugs of abuse in animals. It has high face validity. Compared to repeated systemic injections of drugs of abuse, the self-administration procedures measures the voluntary intake of these drugs and is less stressful (no injections).

The tendency to interpret ambiguous situations pessimistically is a central feature of depression. The ambiguous cue interpretation paradigm can evaluate whether environmental (that is, cocaine exposure) and genetic factors contribute to a negative bias.

Immunostaining allows us to locate changes in protein expression in the LHB-RMtg-VTA-DRN circuitry.

We use neuronal tracing to find out connectivity changes in the Lhb-RMTg-VTA-DRN circuitry associated with the comorbidity between depression and cocaine addiction. In order to minimize the use of animals, we first perform non-cell-type specific tracing to identify the habenula efferents that are altered in association with depression, cocaine self-administration, their comorbidity, as function of serotonin transporter genotype, using the animals from experiment 1a. To confirm the neuronal cell-type of the altered projection of interest we will use serotonin transporter knockout and wild-type rats crossed with a transgenic recombinase rat. This allows us to trace the connection between the receiving neuron and the glutamatergic projection neuron from the habenula. See our explanation in the project proposal.

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

The 5-HTT knockout (5-HTT^{-/-}) rat (Slc6a41Hubr) has been generated by target-selected ENU-induced mutagenesis in a Wistar (Wistar/Crl) background. [REDACTED] 5-HTT^{+/+} littermates are used as controls. CAMKII::Cre (Recombinase expression in glutamatergic neurons) transgenic rats are rats in which the recombinase (Cre) enzyme is under the control of the CAMKII promotor in excitatory neurons (Schonig et al. 2012). GAD67::Cre (Recombinase expression in GABAergic neurons) transgenic rats are rats in which the Cre enzyme is under the control of the GAD67 promotor in inhibitory neurons. Both rats lines will be obtained through a collaboration with [REDACTED]. TH::Cre (Recombinase expression in dopaminergic neurons) and TpH2::Cre (Recombinase expression in serotonergic neurons) rats are already bred in our labs. At the age of 3 weeks, ear cuts are taken and used for genotyping. Animals are housed under standard conditions in groups of two per cage under controlled experimental conditions (12-h light-dark cycle, 21±1 degr C, 60% relative humidity, food and water ad libitum), except where stated otherwise. Adult male and female rats are used see 'Choice and justification animals'.

Pilot study: One group of rats will be implanted with an intravenous catheter in the jugular vein (surgery time: approximately 45-60 minutes) and sacrificed after the surgery. The other group of rats will be stereotactically microinjected within the rostral tegmental area, VTA or dorsal raphe

nucleus with cholera toxin-subunit or rabies virus. Note that separate groups of rats are needed for either virus, because the tracers may well be transferred to the habenula with different speeds; we would to prevent that experiment 1c or 1d fails because of the tracers was not tested.

Experiment 1a. Depression-like behavior and cocaine self-administration in rats

Rats will be implanted with an intravenous catheter in the jugular vein (surgery time: approximately 45-60 minutes) and housed singly. After 6 days of recovery, the rats are trained in the ambiguous cue interpretation test for depression, measuring pessimism versus optimism. In depression there is a bias towards pessimism. Rats are tested in operant boxes. A positive tone (2kHz tone) signals the opportunity to gain a reward (sweetened condensed milk) by pressing the left lever (5 daily training sessions of 30 min). A negative tone (9kHz) precedes the occurrence of an electric foot-shock (60 s at max), which can be prevented or stopped by pressing the right lever (5 daily sessions of 30-60 min). After discrimination training (criterion: 70% correct discrimination between the negative and positive tone) rats are tested for their responses to ambiguous tones with intermediate frequencies (3, 5, and 7kHz). The rats' expectations of a positive or a negative event signalled by these tones were inferred from their lever responses (6 daily sessions of 30-60 min)(Enkel et al., 2010). 'Depressed' rats are expected to prefer the right lever. (**stage i**). After the ambiguous cue interpretation test the rats will be allowed to self-administer cocaine (0.50 mg/kg/injection, intravenous vein) via a fixed ratio 1 (FR1) lever press response for 1 h/day for 10 days using self-administration cages. There will be a second inactive lever in the chamber. This lever has no programmed consequences, but will serve as a control for any non-specific effects. The ambiguous cue used in the ambiguous cue interpretation test signals the location of the active lever, which allows us to assess the initial influence of the rats mood state on cocaine self-administration. Once rats have acquired cocaine self-administration, defined as at least 10 reinforced responses over 1 h with less than $\pm 20\%$ variation in responding from day to day, half of the rats will get extended access to cocaine (6 h daily sessions), for a minimum of 15 sessions under an FR1 schedule of reinforcement until cocaine intake significantly increases (escalation; a hallmark of compulsive cocaine self-administration). The other half of the rats remain on the 1 h schedule to assess regular cocaine self-administration. For the 9 subsequent sessions, rats will be allowed to self-administer cocaine under a progressive ratio (PR) schedule every 3 days, while an FR1 schedule will be used on the two intervening sessions. The PR schedule is based on the following equation: responses/injection $[5 \times e(\text{injection number} \times 0.2)] - 527$, and results in the following sequence of response ratios: 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 32, 40, 50, 62, 77, 95, 118, 145, 178, 219, 268, 328, 402, 492, 603, etc. PR sessions, set at a maximum of 6 hrs, will start when self-administration escalates during extended access (significant increase in cocaine infusions compared to the first extended access session). Once per week the ambiguous cue interpretation training is repeated next to the self-administration session, to keep the rat's memory for the positive and negative tones. The animals will be withdrawn from cocaine self-administration and 24-72 hrs later they will be tested for depressive-like behavior in the ambiguous cue interpretation test. Only the probe test will be repeated, taking one session. (**stage ii**). Thereafter the animals will be allowed to resume cocaine self-administration for 6 FR1 sessions of 6 hrs, followed by decapitation at 24 hrs into withdrawal (**stage iii**). The dependent measurements in the cocaine self-administration procedure include total intake over different sessions, intake during the first hour of daily self-administration, changes in cocaine-loading behavior (first 10 min interval of exposure to daily cocaine self-administration), and breakpoint (final attained ratio). In the ambiguous cue interpretation test we will measure the number of left and right lever responses to ambiguous cue presentation.

The offspring of serotonin knockout rats (5-HTT^{-/-}) used in the experiment will be bred as follows:

| Mother | Father | Offspring | Group |
|----------------------|----------------------|----------------------|---------|
| 5-HTT ^{-/+} | 5-HTT ^{-/+} | 5-HTT ^{-/-} | Subject |
| | | 5-HTT ^{+/+} | Control |

Experiment 1b. Expression of genes in the habenula, rostromedial tegmental nucleus (RMTg), ventral tegmental area (VTA) and dorsal raphe nucleus (DRN)

Half of the rats tested in experiment 1a are transcardially perfused with 4% paraformaldehyde: (i) 24 hours after the ambiguous cue interpretation test, (ii) 24 hours after the ambiguous cue interpretation test taking place during withdrawal from regular or compulsive cocaine self-administration, (iii) 24 hours after the last regular or compulsive cocaine self-administration session. Coronal sections corresponding to the LHb, RMTg, VTA and DRN are immunohistochemically double/triple stained for 1) delta FosB (marker for chronic neuronal activation); 2) GAD67 (Glutamate decarboxylase 67, marks GABA-ergic neurons); 3) Vglut1-3 (vesicular glutamate transporter, marks glutamatergic neurons, the expression of the subtype is region specific), 4) TpH2 (marks serotonergic neurons); 5) TH (marks dopaminergic neurons); 6) 5-HT (serotonin).

Experiment 1c. Retrograde tracing of lateral habenula (LHb)-rostromedial tegmental nucleus (RMTg)-ventral tegmental area (VTA)-dorsal raphe nucleus (DRN) circuit projections.

The other half of rats from stages (i), (ii) and (iii) tested in experiment 1a will be used. Based on data derived from experiment 1a and 1b we may make a considered choice for one stage and/or one projection.

Classical non-cell-type specific method: The rats are stereotactically microinjected with CTb (cholera toxin-subunit) conjugated with Alexa into the VTA, DRN or RMTg under isoflurane anesthesia. Because CTb can serve as retrograde neuron trace marker, the injections will take place in afferent regions, which receive input from the LHb. The decision which afferent to focus on will depend on the data obtained in experiment 1b. The actual location and spread of the CTb is determined afterward using fluorescent microscopy (only first-order neurons can be detected, as it is a monosynaptic tracer). After 1 week rats are transcardially perfused using 4% paraformaldehyde. By combining with immunohistochemistry for GAD67, Vglut, TpH2, and TH, we will characterize the cell-type of the target neurons in the afferent region receiving glutamatergic input from the LHb. We choose this approach as explorative tracing method, because we do not know whether serotonin transporter genotype and/or experimental stage affects known projections in the LHb-RMTg-VTA-DRN circuit (Figure 2), and to minimize the number of animals.

Experiment 1d. Cell-type retrograde tracing of lateral habenula (LHb)-rostromedial tegmental nucleus (RMTg)-ventral tegmental area (VTA)-dorsal raphe nucleus (DRN) circuit projections

Cell-type specific tracing method: To confirm the data from exp 1c and demonstrate that a projection of a specific neuronal cell-type is altered we will apply a cell-type specific tracing approach in experiment 1d using rabies virus. To this end we use a new group of rats. Specifically, we use CAMKII::Cre, GAD67::Cre; TH::Cre or Tph2::Cre transgenic rats bred to 5-HTT knockout rats or wild-type rats. Cre-negative animals are used as

control. Because the breeding is laborious, we will make here a considered choice for one type of breeding (5-HTT x CAMKII::Cre, GAD67::Cre, TH::Cre or TpH2::Cre). The breeding will be conducted as follows:

| Generation | Mother | Father | Offspring | Group |
|------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| First | Cre ^{+/+} | 5-HTT ^{-/-} | 5-HTT ^{-/+} - Cre ^{+/-} | |
| Second | 5-HTT ^{-/+} - Cre ^{+/-} | 5-HTT ^{-/+} - Cre ^{+/-} | 5-HTT ^{-/-} - Cre ^{+/-} or 5-HTT ^{-/+} - Cre ^{+/-} | Subject |
| | | | 5-HTT ^{+/+} - Cre ^{+/-} or 5-HTT ^{+/+} - Cre ^{+/-} | Control |
| | | | 5-HTT ^{-/-} - Cre ^{-/-} | Control |
| | | | 5-HTT ^{+/+} - Cre ^{-/-} | Control |

First, female Cre rats will be crossed with male 5-HTT^{-/-} rats to obtain first generation (G1) 5-HTT^{-/+}-Cre rats; Second, we inbred Generation 1 to obtain Generation 2: male 5-HTT knockout rats expressing Cre in a particular cell type (5-HTT^{-/-} - Cre^{+/-} or 5-HTT^{+/+} - Cre^{+/-}), male 5-HTT knockout rats not expressing Cre (5-HTT^{-/-} - Cre^{-/-}), male 5-HTT wild type rats with Cre being expressing in a particular cell type (5-HTT^{+/+} - Cre^{+/-} or 5-HTT^{+/+} - Cre^{+/-}) and male 5-HTT wild-type rats not expressing Cre (5-HTT^{+/+} - Cre^{-/-}). Note that we use controls for both 5-HTT^{-/-} and Cre expression. It is necessary to control also for Cre expression to exclude the possibility that Cre expression itself influences brain function.

The viral vectors to be used are Cre-dependent AAV-DIO-TVA and AAV-DIO-RG helper viruses, which are injected on day 1 into the ventral tegmental area (VTA), dorsal raphe nuclei (DRN) or rostromedial tegmental nucleus (RMTg) stereotactically under the isoflurane anesthesia. We choose one of the area based on experiment 1b; because rabies virus serves as a transsynaptic retrograde tracer, the injections will take place in afferent regions, which receive input from the lateral habenula (LHb). 21 Days later the EnvA-coated Rabies virus (a genetically modified rabies virus pseudotyped with the avian virus envelope protein (EnvA)) is injected at the same coordinates. As the rabies virus can only transduce cells expressing the TVA receptor, initial transduction and labeling is limited to Cre-expressing neurons. After retrograde transsynaptic labeling of input neurons, further spread of the rabies virus is inhibited due to the RG deletion. In summary, the TVA receptor expression restricts the uptake of the EnvA-pseudotyped rabies virus specifically to Cre-expressing neurons and the RG expression determines the strict monosynaptic spread. After 1 week rats are transcardially perfused using 4% paraformaldehyde to immunostaining.

References:

Enkel, T., D. Gholizadeh, O. v. B. und Halbach, C. Sanchis-Segura, R. Hurlmann, R. Spanagel, P. Gass and B. Vollmayr (2010). "Ambiguous-cue interpretation is biased under stress-and depression-like states in rats." *Neuropsychopharmacology* 35(4): 1008-1015.
Schonig, K., T. Weber, A. Frommig, L. Wendler, B. Pesold, D. Djandji, H. Bujard and D. Bartsch (2012). "Conditional gene expression systems in the transgenic rat brain." *Bmc Biology* 10.

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

Pilot study: We use N = 10 per condition and sex: 1. Intravenous catheterization, 2. CTb tracer injection into the rostral tegmental area, VTA or dorsal raphe nucleus, 3. Rabies virus tracer injection into the rostral tegmental area, VTA or dorsal raphe nucleus. Since male and female rats are anatomically different (e.g. brain coordinates may differ, and the distance between the vene jugularis location of catheter insertion and the heart), it is important to use both males and females for the pilot. We do not consider genotype, since we do not have indications that these anatomical factors differ between the genotypes. Total: 60 rats

Exp 1a-1d: Based on previous behavioural and self-administration studies () and the fact that we split groups (after behavioural testing) into groups for tracing and immunohistochemistry we estimate that we need N=18 for experiment 1a, 1b, 1c,1d (see figure 5 & 6). Rats are tested in groups, always with experimental animals and controls matched. In sum, we need total 90 rats per genotype in experiment 1a, 1b, 1c for each sex (figure 5; 6) (NB: because Cre-negative animals are used as controls we will have four groups for experiment 1d: 5-HTT+/+ and 5-HTT-/-, and Cre+ and Cre-). A power analysis will be conducted for the protocol, and data will be analyzed using unpaired two-tailed t-test; one, two or three-way ANOVAs; one, two or three-way repeated measures ANOVAs.

The total maximum number of animals to be used in this animal procedure is 1140. The animal origin is described in the Table below.

| Experiment | Origin | Genotype | Gender | Maximum Number | Life stage |
|------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------|----------------|------------|
| Pilot | | | Female | 30 | |
| | | | Male | 30 | |
| 1a, 1b, 1c | | 5-HTT ^{-/-} | Male | 90 | |
| | | | Female | 90 | |
| | | Wild type (5-HTT ^{+/+}) | Male | 90 | |
| | | | Female | 90 | |
| 1d | | 5-HTT ^{-/-} - Cre ^{+/-} or 5-HTT ^{-/-} - Cre ^{+/+} | Male | 90 | |
| | | | Female | 90 | |
| | | 5-HTT ^{+/+} - Cre ^{+/-} or 5-HTT ^{+/+} - Cre ^{+/+} | Male | 90 | |
| | | | Female | 90 | |
| | | 5-HTT ^{+/+} - Cre ^{-/-} | Male | 90 | |
| | | | Female | 90 | |
| | 5-HTT ^{-/-} - Cre ^{-/-} | Male | 90 | | |
| | | Female | 90 | | |

References

[Redacted]

B. The animals

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

We use rats, because the intravenous drug self-administration has been developed for rats and does not work for mice.

We use both male and female rats, because drug addiction is more prevalent in males compared to females (SAMHSA 2014, EMCDDA 2016), while depression rates are higher in females than in males (Piccinelli and Wilkinson 2000, Romans, Tyas et al. 2007). Whether their comorbidity specifically affects males or females is unclear. For that reason we will test both sexes.

We use 5-HTT^{-/-} and wild-type rats, because 5-HTT^{-/-} rats (when compared to wild-type counterparts) display increased depression-like behaviour [Redacted] increased intravenous cocaine self-administration [Redacted].

We use CAMKII^{::Cre} (Recombinase expression in glutamatergic neurons), GAD67^{::Cre} (Recombinase expression in GABAergic neurons), TH^{::Cre} (Recombinase expression in Dopaminergic neurons), or Tph2^{::Cre} (Recombinase expression in Serotonergic neurons) rats (which we cross to 5-HTT^{-/-} or wild-type rats) because we aim to trace and manipulate glutamatergic, GABAergic, dopaminergic, or serotonergic neurons in the 5-HTT^{-/-} and wild-type rats using Cre-dependent viral vectors.

For the pilot study genotype is not relevant. We use wild-type or 5-HTT^{-/-} rats, whatever is available/left over from the breeding.

References

Canterberry, M., M. R. Peltier, K. T. Brady and C. A. Hanlon (2016). "Attenuated neural response to emotional cues in cocaine-dependence: a preliminary analysis of gender differences." *Am J Drug Alcohol Abuse* 42(5): 577-586.

EMCDDA (2016). "European Drug Report 2016: Trends and Developments." [European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction](#).

[Redacted]

Kohtz, A. S. and G. Aston-Jones (2016). "Cocaine Seeking During Initial Abstinence Is Driven by Noradrenergic and Serotonergic Signaling in Hippocampus in a Sex-Dependent Manner." *Neuropsychopharmacology*.

Piccinelli, M. and G. Wilkinson (2000). "Gender differences in depression." *Critical review* 177(6): 486-492.

Romans, S. E., J. Tyas, M. M. Cohen and T. Silverstone (2007). "Gender differences in the symptoms of major depressive disorder." J Nerv Ment Dis 195(11): 905-911.

SAMHSA (2014). "Mental Health Services Administration.(2013) Results from the 2012 National Survey on Drug Use and Health: Summary of National Findings." Rockville, MD: Substance Abuse and Mental Health Services Administration.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|------------------------|--------------|---------------------------|------------|
| Rat (wild-type) | own breeding | 180 | PND70-140 |
| Rat (5-HTT-/-) | own breeding | 180 | PND 70-140 |
| Rat (wild-type - Cre-) | own breeding | 180 | PND 70-140 |
| Rat (5-HTT-/- - Cre-) | own breeding | 180 | PND 70-140 |
| Rat (wild-type - Cre+) | own breeding | 180 | PND70-140 |
| Rat (5-HTT-/- - Cre+) | own breeding | 180 | PND70-140 |
| Rat (pilot) | own breeding | 60 | PND70-140 |

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 rat is the best animal model to perform behavioral studies to investigate psychiatric disorders. Because of the complexity of these kind of

disorders, it is impossible to use less complex animals. Indeed, the intravenous cocaine self-administration paradigm does even not work in mice, let alone in invertebrate animals. Specific neural projections cannot be studied in vivo in humans, because of ethical restraints.

Reduction

The requested amount of animals is needed for statistical reliable conclusions and is the minimal group size one can work with. Furthermore, the same animals will be used for a variety of behavioral paradigms and be used for ex vivo studies and non-cell-type specific tracing to obtain a high number of information thereby leading to a minimal amount of animals needed. Experiment 1d will only focus on one of the projections in the lateral habenula (LHb)-rostromedial tegmental nucleus (RMTg)-ventral tegmental area (VTA)-dorsal raphe nucleus (DRN) circuit. This will lead to reduce the amount of animal needed.

Refinement

The experiments will be carried out with the least discomfort possible. For this reason cage enrichment will be applied. Moreover, the analysis we propose cannot be performed without sacrificing animals. As usual, all efforts will be undertaken to minimize animal suffering during sacrifice. Only experienced researchers will sacrifice the animals.

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

The discomfort our rats will be exposed to is limited to the absolute minimum necessary to answer our research questions. Animals will be monitored daily and closely by the caretakers and scored individually for signs of discomfort and checked daily to be able to detect Human End Point conditions and weighted once a week. Handling of the animals will be minimized to reduce human intervention that may cause stress for the animals. Surgery (intravenous catheter implantation and intracerebral infusion of tracers/viral vectors) will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, Lidocaine spray will be applied to the periosteum and the skin of the head. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. Before and after surgery, rats will be subcutaneously injected with Rimadyl (analgesic drug) and Cefazolin (antibiotic drug). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis. Perfusion will take place under deep anesthesia to minimize adverse effects.

Repetition and Duplication

E. Repetition

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

The rats will be singly housed after surgeries. Cage mates are removed because they will damage the cannula or the catheter. Given that a collision with the sharp edges of a shelter may result in the loss of the cannula, shelters are replaced by wooden blocks and nest material.

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

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.

We will handle the animals at least 3 days for 5 min before the start of an experiment. Surgery will be performed under isoflurane anesthesia. In addition, Lidocaine spray will be applied to the periosteum and the skin of the head. Possible bleeding will be stopped using epinephrine pellets. After surgery, rats will be subcutaneously injected with Rimadyl (analgesic drug) and Cefazolin (antibiotic drug). Rats will only be moved to their animal room at 1 hour after surgery. During this period, the wound, breathing and activity of the animal is checked every 15 minutes. During the recovery time of at least 1 week, the animal's condition will be monitored on a daily basis. Perfusion will take place under deep anesthesia to minimize adverse effects.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Rats are exposed to novel test cages, which may cause stress. This stress is about equal to cage cleaning. The rats are socially isolated during cocaine self-administration. This causes stress. In the ambiguous cue interpretation test the rats can receive footshocks (0.5 mA, 1 sec). The footshocks are unpleasant, but not painful, and not associated with burns. Due to stress after surgery, rats may be more afraid to human contact. However, after 3 days of handling, these rats show normal behavior again. The animal's welfare may also be affected by the lack of a shelter or cage mates. Cocaine self-administration itself is not compromising health. Time out periods in the experimental procedure prevents overdoses. During the long access condition, when rats are expected to develop compulsive cocaine self-administration, a hallmark of addiction, rats are tested every day to prevent withdrawal effects. The exception is the measurement of depression-like behaviour during withdrawal (stage II of experiment 1a), which is inherent to the experimental procedure.

Explain why these effects may emerge.

In the ambiguous cue interpretation test the rats can lever press to avoid shocks, although they will be exposed to the footshock during training, when they did not have yet acquired the skills to escape footshocks. Most rats acquire the ability to escape footshocks, and transgenic rats are

better to do so than wild-type rats. These stressors are necessary to measure a depression-related phenotype In experiment 1a depression-like behaviour will be measured during withdrawal from cocaine self-administration, because in humans depression emerges during withdrawal (and motivates the continuation of drug use). There, withdrawal for measuring the comorbidity between depression and cocaine addiction is unavoidable. Finally, it is essential to socially isolate the animals after the surgeries and during the cocaine self-administration procedure as cage mates may harm the catheter/cannulas of the animals. The social housing starts from surgery and continues for the full duration of the experiment. That is: the animals carry the catheter (and later on also the cannula) during the whole experiment and both must remain functional (otherwise we will lose the animals and this will lead to a rise in the number of animals needed for the experiment).

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

Although some stressors are inherent to the experimental design, we will take precautionary measures to minimize all other potential causes of (additional) stress to the animals, by handling the animals extensively and providing the animals wooden blocks and nest material as cage enrichment.

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.

Yes.

The criteria to take the animal out of the experiments are based on human observation of factors known as clear symptoms of pain/stress/discomfort and defined for humane end point detection*. Weight loss of more than 15% in one/two days is considered as humane endpoints. Also general symptoms such as raised fur, hunched back (arched back), poor coat conditions, are also considered as humane endpoints after which the animals should be euthanized. Due to the surgeries and the placing of a cannula some additional endpoints are taken into account: losing of the cannula and weight loss of more than 15% for 3 consecutive days after the surgery. We will contact a veterinarian if there is doubt.

*Standard humane endpoints rodents: piloerection, loss of body weight (> 15%), immobility, poor self-care, tremor, self-damage, abnormal body posture, convulsions, tumors, elephant teeth.

Indicate the likely incidence.

There is 20% chance that any of the animals reach the humane end point over the course of the experiment. This chance is attributed to the surgeries. This drop-out has been included in the number of animals requested.

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).

| Suffering | Rats | Undergo | Number of animals | Experiment | |
|------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------|-------------------|-----|
| Terminal | Male and female | 1 surgery terminal anesthesia | 20 | Pilot | 2% |
| Moderate | Male and female | 1 surgery | 40 | Pilot | 4% |
| Moderate | 5-HTT+/+ male and female rats | 1-2 surgeries | 180 | 1a, 1b, and 1c | 47% |
| Moderate | 5-HTT+/-Cre male and female rats | 2 surgeries and increased depression-like behaviour | 360 | 1d | |
| Severe | 5-HTT-/- male and female | 1-2 surgeries and increased depression-like behaviour | 180 | 1a, 1b, and 1c | 47% |
| Severe | 5-HTT-/-Cre male and female | 2 surgeries and increased depression-like behaviour | 360 | 1d | |

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

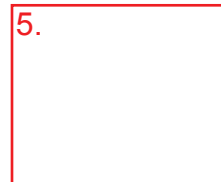
Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

Rats will be sacrificed by perfusion under deep anesthesia, to obtain fixed brains for immunohistochemistry or validation of the placement of the cannula or injection site.

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

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

Yes



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101,
6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD103002017872

Bijlagen

2

Datum 17 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 17 februari 2017. Het gaat om uw project "The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002017872. 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:

17 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD103002017872

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
17 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017872

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101, [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
17 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017872

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

Postbus: 9101, t.a.v. [REDACTED]

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Over uw project

Geplande startdatum: 17 maart 2017
Geplande einddatum: 17 maart 2022
Titel project: The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula
Titel niet-technische samenvatting: Comorbiditeit tussen depressie en cocaine verslaving: de rol van de habenula
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen ([REDACTED])
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Datum:
17 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017872

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: Pieter Verbost
Functie: Instantie voor dierenwelzijn
Plaats: Nijmegen
Datum: 17 februari 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Postbus 9101, t.a.v. [REDACTED]

6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD103002017872

Bijlagen

2

Datum 17 februari 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 17 februari 2017

Vervaldatum: 19 maart 2017

Factuurnummer: 170872

Ordernummer: 040823-461220 /2016-0078 / [REDACTED]

| Omschrijving | Bedrag |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002017872 | € 1035,- |

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

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 6 maart 2017 14:17
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende vraag aanvraag AVD103002017872

Geachte RUDEC,

Op 17 februari 2017 heeft u advies uitgebracht op een projectaanvraag met titel "The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula" en aanvraagnummer AVD103002017872. We danken u voor dit mooi en uitgebreid advies. We hebben toch een vraag erover.

Bij vraag C10 schrijft u dat de huisvesting en verzorging van de dieren conform de eisen in de bijlage III van de richtlijn zijn. In de aanvraag staat dat dieren individueel worden gehuisvest en u heeft bij vraag C11 aangegeven dat er sprake is van individuele huisvesting. We zouden graag willen vragen of het antwoord bij vraag C10 een kennelijke fout was of ziet de DEC die vraag anders?

We zouden u antwoord graag voor vrijdag 10 maart willen ontvangen.

De CCD heeft de aanvrager gevraagd om de redenen waarom in 20% van de gevallen de operatie tot het bereiken van HEP kan leiden nader uit te leggen.

Alvast hartelijk dank.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

[REDACTED])

Van: Info-zbo
Verzonden: maandag 6 maart 2017 13:44
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie aanvraag AVD103002017872

Geachte [REDACTED],

In uw aanvraag met titel 'The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula' en aanvraagnummer AVD103002017872 zitten voor ons enkele onduidelijkheden.

In de bijlage dierproeven, onder punt J. Humane endpoints, schrijft u 'There is 20% chance that any of the animals reach the humane end point over the course of the experiment. This chance is attributed to the surgeries. This drop-out has been included in the number of animals requested.' We zouden graag meer willen weten over de redenen waarom in 20% van de gevallen de operatie kan leiden tot het toepassen van de HEP. Gaat het hier over de vaardigheden van de mensen die de operatie uitvoeren, over de techniek op zich, over mogelijke infecties, over de lokalisatie van het virus?

Graag ontvangen we uw antwoord uiterlijk donderdag 9 maart 2017 om uw aanvraag in de eerstkomende CCD vergadering te kunnen bespreken.

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

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028
E: info@zbo-ccd.nl

Van: [REDACTED] namens [REDACTED]
Verzonden: donderdag 9 maart 2017 17:31
Aan: info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: aanvullende vraag aanvraag AVD103002017872
Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED],

In overleg met de voorzitter van de RUDEC kom ik tot het volgende antwoord op uw vraag.

In de EU-richtlijn staat in de Algemene Bepalingen Artikel 33 (**Verzorging en huisvesting**):

1. Wat betreft de verzorging en de huisvesting van de dieren dragen de lidstaten er zorg voor dat:

- a) alle dieren huisvesting, een omgeving, voedsel, water en verzorging ontvangen die passend zijn voor hun gezondheid en welzijn;
- b) iedere inperking van de mogelijkheid van de dieren om aan hun fysiologische en ethologische behoeften te voldoen, tot een minimum wordt beperkt;
- c) de omgevingsomstandigheden waarin de dieren worden gefokt, gehouden of gebruikt, dagelijks worden gecontroleerd;
- d) regelingen worden getroffen om een eventueel letsel of pijn, onnodig lijden, angst en blijvende schade die vermijdbaar zijn en die worden ontdekt, zo snel mogelijk te verhelpen, en
- e) de dieren onder behoorlijke omstandigheden worden vervoerd.

2. Met het oog op het bepaalde in lid 1, zorgen de lidstaten ervoor dat de in bijlage III omschreven verzorgings- en huisvestingsnormen worden toegepast met ingang van de in die bijlage gespecificeerde data. NL 20.10.2010 Publicatieblad van de Europese Unie L 276/

3. De lidstaten kunnen om wetenschappelijke redenen, of redenen van dierenwelzijn of diergezondheid afwijkingen van lid 1, onder a), en lid 2 toestaan.

Uit punt 3 blijkt dat om wetenschappelijke reden of redenen van dierenwelzijn afgeweken kan worden van 'normale' huisvesting. De individuele huisvesting van dieren om te voorkomen dat hun canule beschadigd wordt door een kooigenoot is in onze ogen dus niet afwijkend van hetgeen in de richtlijn staat.

In bijlage III wordt hier ook naar verwezen: Met uitzondering van de soorten die van nature solitair zijn, moeten dieren in sociaal verband worden gehuisvest in stabiele groepen van compatibele individuen. In gevallen van afzonderlijke huisvesting op grond van artikel 33, lid 3, moet de duur van de afzondering tot het noodzakelijke minimum worden beperkt en moet het visuele, auditieve, olfactorische en/of tactiele contact worden gehandhaafd. De introductie of herintroductie van dieren in bestaande groepen moet zorgvuldig in het oog worden gehouden, teneinde problemen als gevolg van onverenigbaarheid of verstoorde sociale relaties te vermijden.

Dieren die individueel gehuisvest zijn hebben wel visueel, auditief en olfactorisch contact. Hierdoor is de individuele huisvesting van de dieren volgens de RUDEC conform de eisen in bijlage III van de richtlijn.

Graag hoor ik of de CCD het eens is met deze redentatie.

Vriendelijke groeten,

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] Dierexperimentencommissie

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Secretariaat:

[REDACTED]

Dr. [REDACTED]

Thank you for evaluating our DEC application with number AVD103002017872. We received this remark:

There is 20% chance that any of the animals reach the humane end point over the course of the experiment. This chance is attributed to the surgeries. This drop-out has been included in the number of animals requested.' We zouden graag meer willen weten over de redenen waarom in 20% van de gevallen de operatie kan leiden tot het toepassen van de HEP. Gaat het hier over de vaardigheden van de mensen die de operatie uitvoeren, over de techniek op zich, over mogelijke infecties, over de lokalisatie van het virus?

This is our reply:

Thank you for your kind and important comment. The reasons why there is 20% chance that rats may meet to the humane end point are as follows:

- 1) The neural areas we focus on are quite small and most of them are located deep in the brain which are not easy to reach. There is chance that we miss target the regions, because there are small differences between brains of rats and we have to rely on the average brain atlas of the rat.
- 2) Although we will give the rats antibiotic treatment, there are still some unknown risks that the rats may get infected after the surgeries.
- 3) The experiments we propose are long lasting. It is not trivial to keep the catheters open for the whole duration of the experiment. It can happen that blood clots develop and occlude the catheter. We undertake precautions, but this cannot be fully prevented.
- 4) Part of the rats will undergo two dedicated surgeries; the implantation of an intravenous catheter and the stereotact injection of a viral tracer. This doubles the risk that something happens during or after surgery.

We are highly experienced in these surgeries, but please appreciate that these surgeries are complex. The best experts experience some dropout of animals. A 100% success rate is not realistic.

In sum, it is the complexity of the surgeries and the fact that the animals have to undergo the surgery twice that there is 20% chance that the rats may meet the criteria of the humane end points.

Kind regards,

[REDACTED]

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2016-0078
2. Titel van het project: The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula
3. Titel van de NTS: Comorbiditeit tussen depressie en cocaïneverslaving: de rol van de habenula

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer

5. Contactgegevens DEC:

- naam DEC: RUDEC
- telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
- e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]

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

- ontvangen door DEC: 17-11-2016
- aanvraag compleet
- in vergadering besproken: 06-12-2016 en 10-01-2017
- anderszins behandeld
- termijnonderbreking(en) van 12-12-2016 tot 22-12-2016 en 17-01-2017 tot 31-1-2017
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
- aanpassing aanvraag: 22-12-2016 en 31-01-2017
- advies aan CCD: 17-02-2017

7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.

8. Eventueel horen van aanvrager:

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

Algemeen:

- De projectaanvraag is voor de DEC-leden slecht te volgen (zoals de zin bovenaan pagina 35) en daarnaast lastig leesbaar door de vele grammaticale en spellingsfouten en woordverwisselingen (zoals day i.p.v. cage op pagina 18). De commissie verzoekt de

onderzoekers de projectaanvraag makkelijker leesbaar te maken door zorgvuldiger en helderder te formuleren, en bovendien de verschillende onderdelen kort en bondig te beschrijven en informatie die bij dat onderdeel niet gevraagd wordt weg te laten (zoals bijvoorbeeld bij DAP1 onderdeel H waar uitsluitend informatie met betrekking tot pijn en pijnbestrijding wordt gevraagd). De CCD heeft een uitgebreide toelichting gemaakt waarin duidelijk staat vermeld wat bij alle onderdelen ingevuld dient te worden.

- *Antwoord: We corrected grammatical errors in the text, words have been replaced (e.g. day instead of cage), and we have removed the irrelevant information in DAP1 part H. Note that we cannot avoid the naming of brain regions or the technical names of transgenic animal models and vectors, etc.*

Project Proposal:

-3.1: Figuur 1 onderdeel A is een verhelderende illustratie van de positie van de habenula in knaagdierhersenen. De commissie verzoekt u onderdeel B over vishersenen te verwijderen.
Antwoord: We have removed the picture of the fish brain.

-3.4 De experimenten voorafgaand aan het go/no go moment zijn navolgbaar. Het design van de experimenten voor onderdeel 1d en 2 is sterk afhankelijk van de resultaten van de experimenten 1a, 1b en 1c. De commissie is van mening dat onderdelen 1d en 2 van de projectaanvraag nog te prematuur zijn om deze goed te kunnen overzien en te beoordelen. Zoals het nu is geformuleerd laat de tekst teveel ruimte om dit onderdeel later naar eigen inzicht in te vullen. De commissie kan dit onderdeel daarom niet toetsen. De commissie adviseert u deze delen op dit moment niet aan te vragen. Op basis van wat er nu staat zal zij daarover negatief adviseren.

Antwoord: The reasons why we want

[REDACTED]

We know that glutamatergic projections are altered, and now we want to define to which areas the neuron that are altered project to. In our view this is logical next step based on firm preliminary data. The purpose of experiments 1a, 1b,1c, and 1d are to figure out, step by step which of the most significant efferent projections of the lateral habenula neurons have been disturbed, and the cell type of the receiving neurons. We believe that experiment 1d belongs to this aim; experiment 1d is a finetuning of experiment 1c: whereas we determine in experiment 1b the which target area receives differential input from glutamatergic projection neurons from the lateral habenula, in experiment 1d we confirm the type of neuron in the target area that receives the glutamatergic input from the habenula. This information is needed for a causal intervention, as we intended to do in experiment 2. We have now formulated the purpose of the experiments in a different way in the application. It was placed in DAP2 according to advice of the IvD, but after own reconsiderations we strongly belief that experiment 1d belongs to DAP1. We agree that experiment 2 is dependent on the outcome of the tracing studies, and we will ask permission for experiment 2 in a separate DEC application. So, experiment 2 is removed from the current application, and we have only one DAP now.

-3.4: Waarom willen de onderzoekers zowel lange als korte blootstelling aan cocaïne onderzoeken? Dit is niet afdoende onderbouwd.

Antwoord: Short access cocaine self-administration allows the measurement of regular drug self-administration and long access cocaine self-administration allows the measurement of compulsive cocaine self-administration (Ahmed and Koob, 1998; Science). The transition from regular to compulsive cocaine self-administration is associated with a change in emotional state, like the emergence of depression. We want to investigate the addiction process, from regular to compulsive drug self-administration. Either alone is insufficiently informative, because regular drug self-administration is not yet addictive behaviour, and compulsive self-administration is dependent on the establishment of regular drug self-administration. We have added this information in this section.

-3.4.1 en 3.4.3: Het genoemde go/no go beslismoment is niet beschreven bij 3.4.3. Wat gaan de onderzoekers doen als zij alleen verschil vinden in depressie of genotype? Zie ook de eerste vraag hierboven over 3.4.

Antwoord: [redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted]
[redacted] As to whether there are differences in depression before or after cocaine self-administration is not a go / no go decision point, as it is not known for the comorbidity between cocaine addiction and depression what comes first, the addiction or depression. Either is possible, and this study will clarify this. We believe that if we remove experiment 2 from this DEC we have no go/no go decision left over; As indicated in response to point 3.4; we already know that glutamatergic projection neurons are altered in naïve serotonin transporter knockout rats and those with a history of short- and long access self-administration. We will now define to which areas these neurons project to, and with which type of neurons in these projection areas they have connections to. We do make decisions for 1c and 1d, which are based on the outcome of experiment respectively 1b and 1c. This is not a matter of finding a difference or not, but a matter of what kind of difference. Thus, we believe that a go / no go decision in terms whether we should continue with the next experience is not applicable in the new situation where we have removed DAP2. after 1b experiment, we will decide one of the brain areas (connected with lateral habenula) to perform trace study (experiment 1c). We have enriched this information in this section.

-3.4.1: Onderdeel 1a: waarom wordt de test niet ook tijdens cocaïne blootstelling gedaan?
Antwoord: This is because it is impossible to combine the ambiguous cue interpretation test with the self-administration test in one test. The rats then would have to respond simultaneously to get cocaine, food and to avoid shocks. This will become a very messy experiment. Moreover, we would like to investigate depression at baseline, because in drug addicts showing depression and addiction comorbidity the chicken and the egg are not clear; in animals we can study what comes first: the depression or the addiction. By measuring depression under baseline conditions, and thereafter during withdrawal, we will be able to dissociate the chicken and the egg. Moreover, negative emotional states like depression are specifically seen in drug addicts during withdrawal, when the drug is not on board anymore. This is way we measure depression (besides during baseline), also during withdrawal.

Description of Animal Procedures:

*DAP1

-A: Graag alle informatie geven bij elk onderdeel zoals het is gevraagd en toegelicht in de handleiding van de CCD.

Antwoord: We have added information to this section

-A2: Gemeld wordt dat het experiment alleen in mannelijke ratten wordt uitgevoerd. In de tekst en de tabel bij onderdeel B wordt het gebruik van zowel mannen als vrouwen beschreven. De onderzoekers worden verzocht dit in overeenstemming met elkaar te brengen.

Antwoord: After discussion with the IvD before, we changed our plan to use both sexes in this proposal at the end. The rationale was indeed not optimal. We have changed the rationale in the application. Important is that drug addiction is more prevalent in men, and depression in women. Potential sex difference in the development of the comorbidity are not known. This would be great to unravel.

-A2: Het is niet gebruikelijk om oorknipjes onder anesthesie te geven.

Antwoord: This depends on whom we are talking to. We are happy to take earcuts without anaesthesia. We have changed this in the proposal.

-A1 (eerste zin): De commissie adviseert de onderzoekers het woord 'Wistar' weg te laten wanneer niet alleen wildtype Wistar ratten worden bedoeld.

Antwoord: The word has been removed from the proposal.

-A2, exp. 1d: De benodigde 5HTT-/- Cre dieren ontbreken in de tabel met kruisingen. Zoals hierboven al aangegeven, is de commissie bovendien van mening dat het vragen van een vergunning voor dit experiment prematuur is.

Antwoord: These animals have been added to the table.

-B: De commissie vindt de gegeven reden (onemigheid in literatuur of verslaving vaker voorkomt in een van beide geslachten) voor het uitvoeren van alle experimenten in zowel mannen als vrouwen niet terzake doende. Zij is derhalve van mening dat de doelstelling van de projectaanvraag behaald kan worden door dieren van één geslacht te gebruiken, hetgeen tot een significante reductie in het gebruik van dieren met licht tot ernstig ongerief zal leiden.

Antwoord: We prefer to use both males and females. In patients, addiction is more prevalent in males, but females have a higher risk to be diagnosed with depression. The question is whether their comorbidity specifically affects males or females. We will reveal whether there are sex differences in development of the comorbidity and the underlying mechanisms. For that reason we will test both sexes. This also justified in our proposal.

-D: Wat bedoelen de onderzoekers met de opmerking over het gedeeltelijk schoonmaken van de kooien? Is dat specifiek voor dit onderzoek van belang, en is de te volgen procedure uniek voor deze projectaanvraag?

Antwoord: This is because that it reduces the stress of a fully clean cage. We do this in our other approved DEC (2015-0021) as well. We want to prevent that stress interferes with the behavioural measurements; stress can increase drug self-administration and is an important trigger for depression. Given the longitudinal set-up of the experiment we will have to clean cages, but want to prevent in this way that any stress interferes with the behavioural measurements.

-I en K: Wat is het ongerief van de ambiguous cue test, en hoe lang duurt de individuele huisvesting? De commissie mist beide elementen in de beschrijving van het cumulatief ongerief bij K.

Antwoord: Rats are tested in operant boxes. A positive tone (2kHz tone) signals the opportunity to gain a reward (sweetened condensed milk) by pressing the left lever (5 daily training sessions of 30 min). A negative tone precedes (9kHz) the occurrence of an electric foot-shock (60 s at max), which can be prevented or stopped by pressing the right lever (5 daily sessions of 30-60 min). After discrimination training (criterion: 70% correct discrimination between the negative and positive tone) rats are tested for their responses to ambiguous tones with intermediate frequencies (3, 5, and 7kHz). The rats' expectations of a positive or a negative event signalled by these tones were inferred from their lever responses (6 daily sessions of 30-60 min)(Enkel et al., 2010). 'Depressed' rats are expected to prefer the right lever.

*Rats are exposed to novel test cages, which may cause stress. This stress is about equal to cage cleaning. In the ambiguous cue interpretation test the rats can receive footshocks (0.5 mA, 1 sec). The footshocks are unpleasant, but not painful, and not associated with burns. The rats can escape the footshocks, although they will be exposed to the footshock during training, when they did not have yet acquired the skills to escape footshocks. Most rats acquire the ability to escape footshocks, ██████████
██████████ In the ambiguous cue interpretation test we expect that transgenic rats bias more attention towards shock escape than to earning a reward.*

The animals submitted to the ambiguous cue interpretation test will experience moderate stress. In this test the rats may experience the moderate stress in the training phase in which they will be submitted to foot-shocks, and after training if they present a higher depression-like symptom, they may still experience this stress.

-K: Het ongerief voor de dieren die één operatie ondergaan in combinatie met de overige handelingen is matig.

Antwoord: Thanks for reminding. We have replaced it.

*DAP2

De DEC wijst u er op dat zij hierboven heeft aangegeven het vragen van een vergunning voor deze experimenten op dit moment prematuur te vinden.

Antwoord: We have removed DAP2

Niet technische samenvatting:

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: We have adjusted the NTS.

- Gestelde vragen en antwoorden:
- Datum vragen: 17-01-2017
- Datum antwoorden: 31-01-2017

Project Proposal:

- Op sommige plaatsen (bv. 3.4.2) wordt nog verwezen naar het (inmiddels verwijderde) experiment 2. S.v.p. alle verwijzingen verwijderen.

Antwoord: We have removed references to Experiment 2 were we could find it.

-De commissie heeft de onderzoekers eerder gevraagd uit te leggen waarom zij zowel lange als korte blootstelling aan cocaïne willen onderzoeken, maar is nog niet tevreden met het gegeven antwoord. Nadat dieren geleerd hebben om zichzelf cocaïne toe te dienen via een fixed ratio 1 schema in experiment 1a, wordt de groep in tweeën gesplitst waarbij de helft toegang krijgt tot langdurige zelf-toediening (compulsive self-administration) terwijl de andere helft op het reguliere schema (regular drug self-administration) blijft. Zowel het antwoord op vraag 3.4 als de uitleg op pagina 21/37 maakt de commissie niet duidelijk waarom beide toedieningsvormen nodig zijn. Het gaat er toch alleen maar om de dieren verslaafd te krijgen. Een en ander betekent dat de commissie op dit punt geen gefundeerde ethische afweging kan maken. De commissie verzoekt aanvragers om op dit punt helderheid te verschaffen.

Antwoord:

Short access = regular drug self-administration

Long access = compulsive drug self-administration

*Please see our previous answer: Reply: Short access cocaine self-administration allows the measurement of regular drug self-administration and long access cocaine self-administration allows the measurement of compulsive cocaine self-administration (Ahmed and Koob, 1998; Science). The transition from regular to compulsive cocaine self-administration is associated with a change in emotional state, like the emergence of depression. We want to investigate the addiction process, from regular to compulsive drug self-administration. **Either alone is insufficiently informative, because regular drug self-administration is not yet addictive behaviour, and compulsive self-administration is dependent on the establishment of regular drug self-administration.***

The research topic is about the comorbidity between addiction and depression. However, this final stage does not build up directly from a healthy condition. People first start to use drugs on a regular basis, while drug use is still under control. So, self-administration per se is not addictive behaviour; like we may drink every evening a glass of wine during dinner. In a subset of drug users this regular use turns into compulsive use (i.e. uncontrolled use) and depression emerges (or was already present before and represents a reason to start using drugs in the first place). We cannot skip this regular drug intake phase, because then compulsive drug intake will not happen. Furthermore, this regular drug intake phase is needed to properly interpret findings. Indeed, a computational theory of cocaine addiction suggests that cocaine reinforces behavior due to its rapid homeostatic corrective effects, whereas its chronic use induces slow and long-lasting changes in homeostatic set-point (Keramati, Durand et al. 2017). Without the regular self-administration group, conclusions about the compulsive drug self-administration effects would be different. We have tried to make this clear throughout the proposal.

Description of Animal Procedures:

-B: Er worden vrij veel dieren aangevraagd voor het oefenen van de operaties. Is het noodzakelijk om beide operaties bij zowel mannelijke als vrouwelijke dieren te oefenen? De dieren die een stereotactische operatie krijgen worden pas na twee weken gedood. Is het mogelijk om de tweede (terminale) operatie ook op deze dieren te oefenen?

Antwoord: Brain structures between male and female are different, for example, nucleus of the preoptic area is three to eight times larger in male rats compared to female rats (Swaab 1995). The thickness of cerebral cortex is different between male and female rats (<http://education.jhu.edu/PD/newhorizons/Neurosciences/articles/Male%20and%20Female%20Brains/>). The differences can disturb the parameters of injection site and injection volume of virus. So the location of stereotactic injection should be modified base on the pilot study in both females and males.

Yes we can. But it is really easy to become unskilled when there is a time gap between the practice and the actual experiment. In experiment 1a, we will first do the intravenous catheterization, so we have to practice this surgery first while the stereotactic surgery is not needed at this stage yet. If we would combine the two surgeries, and it is time for experiment 1c or 1d, the researchers may have become unskilled because there was too much time in between the training and the actual experiment. Losses will be greater of the actual experiment fails because of this.

-D : De onderzoekers hebben geantwoord dat het gedeeltelijk schoonmaken van de kooien ook wordt toegepast bij de dieren uit project 2015-0021. De commissie kan de beschrijving van deze werkwijze voor het gedeeltelijk verschonen van de kooien niet terugvinden in de beschrijving van project 2015-0021 en de bijbehorende werkprotocollen. Zij verzoekt de onderzoekers daarom dit uit de aanvraag te verwijderen.

Antwoord: We also could not find it back in the accepted version, but in a previous version. We apologize for the incorrect reference. Nonetheless, we thought it would be an elegant way to reduce the stress for the animals; stress may interfere with the depression and self-administration sessions, especially because the latter takes place daily. It is not necessary that caretakers do the cage cleaning, researchers can do as well, when it is better for their experiments. We have removed this method now from the proposal. We have no alternative.

-I: De individuele huisvesting ontbreekt nog in de opsomming van ongerief.

Antwoord: We have added this information.

-I3: De dieren kunnen toch juist niet sociaal gehuisvest worden vanwege de canule?

Antwoord: It is essential to socially isolate the animals after the surgeries and during the cocaine self-administration procedure as cage mates may harm the catheter/cannulas of the animals. The social isolation starts from surgery and continues for the full duration of the experiment. That is: the animals carry the catheter (and later on also the cannula) during the whole experiment and both must remain functional. Otherwise we will lose the animals and this will lead to a rise in the number of animals needed for the experiment. Also, the animals may harm each other, they can pull off each other's catheter or cannulas with dental cement. That is really painful and leads to bleeding/wounds. The suffering of the social isolation is clearly less than wounds that the animals may get by social interactions that go wrong.

-K: De commissie heeft gevraagd hoe lang de individuele huisvesting duurt, maar heeft nog geen antwoord hierop gekregen.

Antwoord: Please see our answer to comment I3: we socially isolate the animals after the surgeries and during the cocaine self-administration procedure as cage mates may harm the catheter/cannulas of the animals. The social isolation starts from surgery and continues for the full duration of the experiment. That is: the animals carry the catheter (and later on also the cannula) during the whole experiment and both must remain functional. Otherwise we will lose the animals and this will lead to a rise in the number of animals needed for the experiment. The whole experiment takes between 66-90 days. We cannot be very precise, because the duration is dependent on the performance of the animals. If it takes longer for animals to learn the behavioural tests, we will give them more time. We can only determine that during the experiment. We will not switch animals to a next stage because of the time, but only if they perform as required. If we use time as criterion we may lose animals. Behaviour is namely not like maths, it cannot be fully predicted.

-K: Is het ongerief voor de dieren in de pilot groep die een stereotactische operatie ondergaan en nog enkele weken gevolgd worden juist ingeschat?

Antwoord: We have changed the suffering to moderate and terminal according to the EU-directive 2010/63/EU.

Niet-technische samenvatting

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: We have made the appropriate changes.

References

Keramati, M., A. Durand, P. Girardeau, B. Gutkin and S. H. Ahmed (2017). "Cocaine Addiction as a Homeostatic Reinforcement Learning Disorder." Psychol Rev.

Swaab, D. F. (1995). "Development of the human hypothalamus." Neurochem Res 20(5): 509-519.

- 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 is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Invulling definitie project' van de CCD. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, na vragen van de commissie, besloten om het deel van de aanvraag dat als prematuur werd beoordeeld op een later tijdstip in een aparte aanvraag te verwerken. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.
2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het korte termijn doel van het project is te onderzoeken welke rol de laterale habenula speelt in de comorbiditeit van drugsverslaving en depressie in ratten met een genetische aanleg voor zowel verslaving als depressie. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van nieuwe behandelingen voor mensen die zowel verslaafd als depressief zijn. De aanvragers zullen door de voorgestelde experimenten fundamentele kennis vergaren bij ratten over het cocaïneverslavingsproces en daarbij optredende verschijnselen van depressie, en het wordt duidelijk welke hersengebieden en neuronen daarbij betrokken zijn. Die kennis is van groot belang voor een beter begrip van verslaving en preventie of behandeling daarvan. De DEC is van mening dat er binnen dit project geen directe relatie is tussen het korte termijn doel en het uiteindelijke doel, maar het doel van deze projectaanvraag is gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmogelijkheden. Carrière mogelijkheden en welstand kunnen door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dienen naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis). Er dient tenminste (ook) sprake te zijn van een algemeen of publiek belang, wil een dierproef gerechtvaardigd zijn.

Voor patiënten/de samenleving is dit onderzoek indirect en op de lange termijn van belang. De huidige behandelingen van depressie en van verslaving zijn in veel gevallen niet succesvol. Een combinatie van depressie en verslaving is nog moeilijker te behandelen. Wanneer er een effectieve behandeling gevonden wordt voor de combinatie van depressie en verslaving, dan kunnen deze mensen weer beter functioneren en hebben zij een betere kwaliteit van leven. Uiteindelijk zouden de verworven inzichten kunnen bijdragen aan het ontwikkelen van zo'n behandeling. Vermindering van de verslavingsproblematiek is van groot belang voor de samenleving.
6. De onderzoekers maken gebruik van genetisch gemodificeerde virale vectoren en transgene dieren waarbij zij de nationale GGO-regels in acht nemen. Hierdoor is er geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd, ondermeer doordat de operaties geoefend worden voordat ze in het kader van het experiment worden uitgevoerd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvragers, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en

uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Om de wisselwerking tussen depressie en het verslavingsproces te onderzoeken is het noodzakelijk het onderzoek uit te voeren met ratten die worden blootgesteld aan verschillende cocaïne zelftoedieningsregimes.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
 - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de benodigde operaties, de (kortdurende) onthouding van cocaïne, de langdurige individuele huisvesting, en de gedragstesten. De combinatie van alle handelingen leidt tot terminaal ongerief voor 2% van de dieren, matig ongerief voor 51% van de dieren en ernstig ongerief voor 47% van de dieren.
12. De uiterlijke integriteit van dieren wordt aangetast door het aanbrengen van een intraveneuze canule waardoor de dieren zichzelf cocaïne kunnen toedienen. Ook het induceren van een cocaïneverslaving kan worden beschouwd als een aantasting van hun integriteit, omdat ze voor hun welzijn afhankelijk worden van cocaïne. Het normale gedrag van de dieren verandert hierdoor.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van eerdere ervaringen met (stereotactische) operaties ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. In dit onderzoek worden metingen in bepaalde hersengebieden gekoppeld aan complex (depressief) gedrag. Het gedragsrepertoire van de rat is voldoende uitgebreid om dit te kunnen meten. Minder complexe diersoorten zijn hiervoor niet geschikt.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie

om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervolggewijzen wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De aanvrager zal de vraagstelling zowel in mannelijke als in vrouwelijke dieren apart onderzoeken, omdat nog niet bekend is of de comorbiditeit van verslaving en depressie vooral in één van beide geslachten optreedt. Vanwege de verschillen tussen mannelijke en vrouwelijke hersenen zullen de operaties ook op beide geslachten worden geoefend.

16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De onderzoekers passen anesthesie en pijnbestrijding toe voor de handelingen waarvoor dit vereist is. Ter voorbereiding op de beoogde gedragstest worden voetschokken gegeven, maar de dieren leren om deze actief te vermijden. Voor de dieren die een genetische aanleg voor depressie hebben zal het ongerief oplopen tot ernstig, ondermeer omdat zij naar verwachting niet goed zijn in het leren vermijden van de voetschokken. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

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

19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om de hersenen te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?

2. Er vindt een terminale, matige of ernstige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen er alles aan om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.

Voor patiënten is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun (geestelijke) gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Verslaving en depressie hebben een grote impact op zowel de patiënten als hun directe omgeving en de maatschappij. Een groot deel van de drugsverslaafden is ook depressief, waardoor het nog lastiger is hen te behandelen. Op dit moment is er nog geen medicamenteuze therapie voor cocaïneverslaving. De resultaten van dit project zullen bijdragen

aan meer kennis over de interactie tussen het verslavingsproces en depressie bij ratten en de hersengebieden en neuronen die daarbij betrokken zijn. Op de lange termijn kunnen deze resultaten bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor mensen die zowel verslaafd als depressief zijn. De commissie acht dit van groot belang.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: onderzoeken welke rol de laterale habenula speelt in de comorbiditeit van drugsverslaving en depressie in ratten met een genetische aanleg voor zowel verslaving als depressie. Het uiteindelijke doel daarvan is het ontwikkelen van nieuwe behandelingen voor mensen die zowel verslaafd als depressief zijn. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten en de maatschappij voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Voor de dieren die een genetische aanleg voor depressie hebben kan het ongerief oplopen tot ernstig. Dit onderzoek richt zich juist op de combinatie van depressie en verslaving, waardoor het onderzoek niet alleen uitgevoerd kan worden met dieren die geen last hebben van depressieve verschijnselen. De commissie is daarom van mening dat de doelstelling van het onderzoek niet behaald kan worden zonder deze dieren. De aard van het klinische en het maatschappelijke probleem rechtvaardigen het ernstig ongerief voor deze dieren. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

- X 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.
- o Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- o Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

[Redacted]

Postbus 9101, [Redacted]

6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD103002017872

Bijlagen

1

Datum 14 maart 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,

Op 17 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula" met aanvraagnummer AVD103002017872. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 8 maart 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de vraag van de CCD over de humane eindpunten beantwoord.

Beslissing

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

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

U kunt met uw project "The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula" starten. De vergunning wordt afgegeven van 17 maart 2017 tot en met 16 maart 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de looptijd van de vergunning maximaal 5 jaar is.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC 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 hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 9 maart 2017 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. De DEC heeft de vraag van de CCD over de huisvesting van de dieren beantwoord.

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

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

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:

AVD103002017872

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
14 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017872



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres: Postbus 9101, [REDACTED]

Postcode en plaats: 6500HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 17 maart 2017 tot en met 16 maart 2022, voor het project "The mechanisms of depression and cocaine addiction comorbidity in the habenula" met aanvraagnummer AVD103002017872, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 17 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 februari 2017, ontvangen op 17 februari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 8 maart 2017

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------|--------------------------------------------------|-------------|
| 3.4.4.1 Behaviour and tracing | | | | |
| | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / | 1.140 | 2% Terminal 47% Ernstig 51% Matig | |

Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk maart 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

Aanvraagnummer:
AVD103002017872

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

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



Aanvraagnummer:

AVD103002017872

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:
AVD103002017872

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Beoordeling achteraf

Volgens artikel 10a1, lid 1d en lid 3 van de wet worden projecten waarbij niet-menselijke primaten worden gebruikt, projecten die als ernstig ingedeelde dierproeven omvatten of een dierproef die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, achteraf beoordeeld worden.

| Inventaris Wob-verzoek W17-08 | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|--|------|
| nr. | document NTS 2017873 | 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 oud | | | x | | | | | | |
| 3 | Projectvoorstel | | | x | | | | | | |
| 4 | Bijlage oud | | | | 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 | | | | | | |
| 8 | Bijlage nieuw | | | | x | | | x | | |
| 9 | NTS nieuw | x | | | | | | | | |
| 10 | DEC advies | | | | x | | x | x | | |
| 11 | Advies CCD | | x | | | | | | | x |
| 12 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | | |

AVO 10300 2017 870



1.

22 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.zbo-ccd.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 10300
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

| | |
|-----------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Naam instelling of organisatie | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | Instantie voor dierenwelzijn |
| KvK-nummer | 4 1 0 5 5 6 2 9 |

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 | Geert Groteplein 10 |
| Postbus | 9101, [redacted] |
| Postcode en plaats | 6500HB Nijmegen |
| IBAN | NL90ABNA0231209983 |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer | UMC St Radboud |

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

| | | |
|-----------------------------|------------|-----------------------------------------------------------------------|
| (Titel) Naam en voorletters | [redacted] | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | [redacted] | |
| Afdeling | [redacted] | |
| Telefoonnummer | [redacted] | |
| E-mailadres | [redacted] | |

1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.

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

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

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
- Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
- Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
- Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3
- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?
- Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het 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 | 17 - 03 - 2017 |
| Einddatum | 17 - 03 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Interneurons, oscillations, and learning
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Neuronen, oscillaties, en leerprocessen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-------------------------------------------|
| Naam DEC | RU DEC |
| Postadres | Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED] |
| E-mailadres | [REDACTED] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.035,00 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
- DEC-advies en factuurinformatie

6 Ondertekening

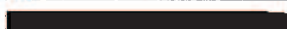
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). 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 Nijmegen

Datum 17 - 02 - 2017

Handtekening 

Format**Niet-technische samenvatting**

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

1 Algemene gegevens

- | | | |
|-----|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 1.1 | Titel van het project | <u>Neuronen, oscillaties, en leerprocessen</u> |
| 1.2 | Looptijd van het project | <u>17-3-2017 - 17-3-2022</u> |
| 1.3 | Trefwoorden (maximaal 5) | <u>Hersenen, leren, beloningen, oscillaties, neuronale communicatie</u> |

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.

U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.

- | | |
|-------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | <u>Fundamenteel onderzoek</u> |
| <input type="checkbox"/> | <u>Translationeel of toegepast onderzoek</u> |
| <input type="checkbox"/> | <u>Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie</u> |
| <input type="checkbox"/> | <u>Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier</u> |
| <input type="checkbox"/> | <u>Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort</u> |
| <input type="checkbox"/> | <u>Hoger onderwijs of opleiding</u> |
| <input type="checkbox"/> | <u>Forensisch onderzoek</u> |
| <input type="checkbox"/> | <u>Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven</u> |

3 Projectbeschrijving

| | | |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.1 | Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | De executieve functies (EF), zoals gedragsaanpassingen, het werkgeheugen, en besluitvormingsprocessen, zijn belangrijk voor het functioneren in de samenleving. Verstoringen van de EF zijn een belangrijk onderdeel van hersenziekten zoals Parkinson, ernstige depressie, en schizofrenie. Het meeste onderzoek naar de EF is in mensen gedaan. In mensen kan de gemiddelde activiteit van miljoenen hersencellen tegelijk gemeten worden. Uit onderzoek bleek dat zogenoemde "elektrische hersengolven" een teken zijn van EF. Maar wat precies zijn die hersengolven en wat doen ze voor de communicatie tussen hersengebieden die belangrijk voor EF zijn? De bedoeling van ons onderzoek is meer inzicht vergaren in de neurale mechanismen van de EF en de manier waarop zij betrokken zijn bij leerprocessen en het nemen van beslissingen. Wij gebruiken daarvoor muismodellen. Hierdoor kunnen wij elektroden in de hersenen plaatsen en de activiteit van individuele hersencellen, groepen van hersencellen, en populatie activiteit tegelijkertijd meten. Daardoor kunnen wij de processen van de EF nauwkeuriger in kaart brengen en begrijpen. |
| 3.2 | Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | Er zijn vele fundamentele vragen over hoe informatie wordt verwerkt binnen het "EF netwerk" zoals: hoe wordt informatie gedeeld binnen deze regionen, hoe beïnvloedt het EF netwerk processen in sensorische gebieden, wat is de rol van verschillende soorten neuronen hierin, en op welke manier beïnvloedt het EF netwerk bepaalde leerprocessen? Dit fundamentele onderzoek is van belang om in de toekomst beter te kunnen begrijpen wat er in de hersenen mis kan gaan, zoals bijvoorbeeld bij de ziekte van Parkinson. Wij zullen ook al onze data beschikbaar maken aan de wetenschappelijke gemeenschap, waardoor collega's deze data kunnen gebruiken voor het beantwoorden van hun eigen onderzoeksvragen. De resultaten van ons onderzoek kunnen gebruikt worden voor onderzoek naar cognitie en om computermodellen te maken waarmee bepaalde aspecten van de hersenfunctie onderzocht kunnen worden. |
| 3.3 | Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | Maximaal 395 muizen over 5 jaar. |
| 3.4 | Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | Om goede metingen te kunnen verrichten worden er speciale elektroden in het brein geplaatst middels een operatie. Deze operaties en het bijkomen uit narcose zullen tot tijdelijk ongerief leiden. Anesthesie, pijnstilling en antibiotica worden gebruikt om dit tot een minimum te beperken. Wij gebruiken lichte water- en voedselbeperkingen om de gedragsmotivatie van de muizen te verhogen. Zij krijgen sap en andere beloningen tijdens de experimenten. Tijdens de metingen mogen de dieren hun kop niet bewegen. De kamer die zij op hun kop dragen om de elektroden te beschermen wordt daarom vastgezet gedurende maximaal 90 minuten per dag. De dieren wennen hier geleidelijk aan. Als tijdens de metingen blijkt dat een dier teveel stress heeft dan worden de metingen gestopt en kan het weer vrij bewegen. De dieren kunnen vanwege de kamer op hun kop niet met soortgenoten in één kooi verblijven. |
| 3.5 | Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | Alle dieren ondergaan vergelijkbare handelingen die een matig ongerief als gevolg hebben. |

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop? Alle dieren worden na afloop van de proef gedood (door middel van anesthesie pijnloos) om hersenweefsel te onderzoeken.

4 Drie V's

- 4.1 **Vervanging** Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdier vrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden. Metingen in mensen zijn niet precies genoeg om zenuwcellen te meten. Daarom zijn dierproeven die hier beschreven worden nog noodzakelijk. De resultaten kunnen gebruikt worden om betere computermodellen te maken waardoor sommige onderzoeksvragen in de toekomst zonder proefdieren kunnen worden beantwoord.
- 4.2 **Vermindering** Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. Wij gebruiken speciale en nieuwe elektroden die heel veel gegevens kunnen verzamelen per dier, waardoor we minder dieren nodig hebben om onze onderzoeksvraag te beantwoorden. Wij maken onze meetgegevens openbaar beschikbaar aan de wetenschappelijke gemeenschap. Andere wetenschappers zullen daardoor minder dierproeven hoeven te doen. We zullen het kleinst aantal dieren gebruiken waarmee nog wetenschappelijk betrouwbare resultaten zijn te behalen.
- 4.3 **Verfijning** Verklaar de keuze voor de diersoort(en). Verklaar waarom de gekozen diersmodel(len) de meest verfijnde zijn, gelet op de doelstellingen van het project. Wij hebben ervoor gekozen om de hersenen van muizen te onderzoeken, omdat deze dieren over executieve functies beschikken die voldoende lijken op de executieve functies van mensen. Bij minder complexe diersoorten is dat niet het geval. De experimenten en diersmodellen die we gebruiken staan bekend om de betrouwbare resultaten. Wanneer mogelijk werken wij aan het verbeteren van onze experimenten en procedures. Het is onze overtuiging dat de beste resultaten behaald worden met gezonde dieren met een zo laag mogelijk stressniveau. We doen er dan ook alles aan om de stress voor de dieren te verminderen, bijvoorbeeld door kleine en lichte elektroden te maken met 3D printing.
- 4.4 Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden. Alle handelingen zullen worden verricht door ervaren personeel. Alle dieren krijgen de tijd om te wennen aan de nieuwe leefomgeving en de onderzoeker. Muizen moeten alleen gehuisvest worden, maar ze zullen regelmatig onder toezicht contact hebben met soortgenoten. Rondom operaties zal adequate pijnstilling worden gegeven. Rondom operaties wordt nutriëntenrijk voedsel aangeboden om het herstel te bevorderen. In alle gedragsproeven worden muizen beloond (sap, yoghurt, water, enz.). De dieren krijgen nooit vervelende of pijn prikkels.

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'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Interneurons, oscillations, and learning |

2 Categories

- | | | |
|-----|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input checked="" type="checkbox"/> Basic Research |
| | | <input type="checkbox"/> Translational or applied research |
| | | <input type="checkbox"/> Regulatory use 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.
-

EXECUTIVE FUNCTIONS AND THEIR IMPAIRMENTS

Executive functioning refers to the ability to monitor the environment for mistakes, conflicts, or negative performance feedback, and to initiate rapid but flexible action adjustments to optimize goal-directed behavior (Botvinick et al., 2001; Ridderinkhof et al., 2004). Stimulus-reward association learning is an important aspect of executive functioning, and is amenable to careful neuroscientific investigation because all mammals (including mice, the species under investigation in this research) are capable of forming new stimulus-reward associations. Therefore, fundamental insights into the organization of the executive functioning network can be obtained by studying this network during learning, as well as during spontaneous activity.

Impairments in executive functions are seen in several clinical disorders including major depression and schizophrenia. Understanding the neural circuitry underlying executive functioning may lead to a significant advance in understanding disorders of executive functioning, as well as studying the effects of treatments. In this research, we will focus on the role of subclasses of neurons in regulating rhythmic neural activity and inter-regional synchronization, and how those processes are related to reward learning.

NEURAL OSCILLATIONS IN CIRCUITS UNDERLYING EXECUTIVE FUNCTIONS

Executive functioning relies on a network of inter-connected brain regions, mainly including the prefrontal cortex, parietal cortex, and striatum/basal ganglia (for convenience, this collection of systems will be referred to as the "executive functioning network"). For example, lesions to the medial prefrontal cortex of rats leads to impairments in decision-making and increased impulsivity (Courtière et al., 2007; Walton et al., 2002). Neural oscillations -- rhythmic fluctuations in the excitability of populations of neurons -- are important markers of neural activity. Neural oscillations can be measured through the local field potential -- very thin electrodes placed inside the brain -- and through the electroencephalography (EEG) -- larger electrodes placed on the skull (on the scalp in humans).

Theta-band (4-8 Hz) oscillations in the medial prefrontal cortex are strongly associated with executive functioning in humans (see Cohen 2014, for a review). It has been speculated that theta oscillations are used to synchronize brain activity across regions within the executive functioning network, and between this network and sensory processing areas. In other words, it is thought that neural oscillations are crucial for executive functioning,

and that understanding the role of neural oscillations in executive functioning will lead to advances in understanding healthy executive functioning and impairments in executive functioning in clinical disorders. However, the precise role of oscillations is very difficult to understand using non-invasive methods in humans. Therefore, rodent models are necessary.

ROLES OF INTERNEURONS IN NEURAL OSCILLATIONS AND EXECUTIVE FUNCTIONS

There are thousands of different types of cells in the brain. However, neurons can be broadly classified as excitatory or inhibitory. Excitatory (glutamatergic) neurons comprise approximately 75% of the neurons, while inhibitory interneurons are in the minority. However, research is increasingly demonstrating that inhibitory interneurons play key roles in regulating network activity and oscillations, and neural computations (Markram et al., 2004). Furthermore, interneurons can be categorized into different groups according to their molecular signatures, which in turn defines their functional/anatomical properties. In this research, we will focus on four specific subclasses of neurons:

Parvalbumin-positive interneurons (PVB): These cells target primarily perisomatic regions of pyramidal cells and are implicated in high-frequency gamma-band oscillations (Hu et al., 2014).

Somatostatin-positive interneurons (SOM): These cells target primarily dendritic arbors and are implicated in lower-frequency theta/alpha oscillations (Urban-Ciecko and Barth, 2016).

Vasoactive intestinal polypeptide-containing interneurons (VIP): These cells target primarily other interneurons (Pi et al., 2013). VIP cells seem to have an important role in disinhibition, in other words, blocking the inhibition. However, they have not been extensively characterized in terms of their roles in neural functioning and network dynamics.

Pyramidal cells: Interneurons, though important, are a minority of the cells in the brain; most brain cells are pyramidal. Pyramidal cells are thought to be the computational powerhouse of the brain, encoding and transmitting important information about the sensory environment and motor output plans. It is important to include pyramidal cells in the study of interneurons to disambiguate general effects of neural activity from subclass-specific effects.

Relatively little is known about the roles of different interneuron types in oscillations and inter-regional synchronization in the executive functioning network. To make matters more complicated, most of the research on these interneurons is done in cell cultures or in primary sensory regions. Their contributions to regulating activity within the executive network are likely to be at least somewhat different from their roles in primary sensory regions. For example, although PVB cells are strongly implicated in gamma oscillations in visual cortex, PVB cell density is lower in the medial prefrontal cortex (Dombrowski et al., 2001), and the medial prefrontal cortex is dominated by lower-frequency theta oscillations, in contrast to primary sensory regions. Furthermore, short-term plasticity characteristics differ between medial prefrontal and sensory areas (Wang et al., 2006). In other words, although there are certainly features of neural dynamics that are conserved across the brain, there are also region-specific features that require detailed investigations of each brain region.

INTERNEURONS, OSCILLATIONS, AND LEARNING

Learning and decision-making are among the most important executive functions, and are hallmarks of impairments in many psychiatric disorders. It is known that neural oscillations and inter-regional synchronization are involved in stimulus-reward learning (Pennartz et al., 2011). Much less is known about the roles of interneuron classes on reward learning. Most of the existing work on motivated learning concerns fear conditioning and cocaine addiction (Nieh et al., 2013). Certainly these are important and clinically relevant topics of investigation. But a considerable amount of real-life learning involves simpler and less dramatic learning processes (e.g., reward-based learning) that require integration across cortical, striatal, and sensory-processing areas. Therefore, we will focus on simple stimulus-reward learning as a model to understand the role of neuron subtypes in synchronizing brain circuits during learning. During stimulus-reward learning, network-level neural synchronization is increased between the medial prefrontal cortex, striatum, and sensory processing regions. Our research will focus on the roles of different neuron subclasses in changes in these

patterns neural synchronization that occur during learning. This will be achieved by recording neural activity before, during, and after learning, as well as by interrupting activity in specific types of neurons during the learning process.

Our research involves focusing both on fundamental mechanisms of brain network dynamics, and on understanding how these fundamental mechanisms are involved in sensory processing and stimulus-reward association learning.

Note that learning is not the only situation associated with oscillations. Neural oscillations are present in many different behavioral/cognitive states, including running, memory, and even sleep. We focus on learning in this research because it allows us to link our findings to theories and data from human about the roles of neural oscillations in learning. Because oscillations are a fundamental feature of brain activity, it is likely that many aspects of our findings are also applicable to other cognitive/behavioral states. Learning per se has been studied extensively over the past century. We will use well-established basic learning experiment paradigms that allow us to link our novel findings (roles of interneurons in synchronization) to the established literature, including the literature in humans.

OSCILLATIONS IN EEG: WHAT DO THEY MEAN?

In humans, EEG is the primary method for studying the electrical activity of the brain. Oscillations are one of the most prominent features in the EEG signal. However, in humans it is not possible to link the EEG signal to lower-level neural activity. Thus, an important implication of our research is to help understand what happens in the brain when different EEG signals are measured. To answer this question, all animals will have EEG recorded from the skull along with recordings of lower-level neural activity (neurons and local field potential).

WHY WE ARE DOING THIS RESEARCH

The overall goal of the research in our group is to understand the roles of neural oscillations in executive functioning. We have several ongoing projects that span humans, computational models, rats, and mice. Each method has its advantages. The primary advantage of mice is the ability to use cutting-edge genetic tools to target specific classes of neurons (focusing on PVB, SOM, VIP, and pyramidal). These mouse lines in combination with optogenetics allow us to manipulate the activity of these subclasses. Mice provide a good balance between molecular specificity and cognitive/neural development. Thus, this project is a core component of our lab's ongoing research.

The result of this research will be a better understanding of how different types of neurons contribute to stimulus-reward association learning. This will be applicable to basic research in brain function and executive control, as well as interpreting patterns of results seen in human EEG studies. By incorporating neural stimulation, this research also has important translational and application value. For example, brain stimulation techniques (transcranial magnetic and electrical stimulation) are increasingly being applied as a treatment option in humans for Parkinson's disease and major depression, among other disorder. Our research will help understand how these manipulations affect neural activity in the brain systems most important for executive functioning.

Another important component of this research is the application and development of cutting-edge data analysis techniques for characterizing neural activity. We will also make our data available (at data.donders.ru.nl, a university-supported infrastructure for storing, managing, and public sharing of research data) to other scientists for further development and analysis. In this way, the data will be used beyond our research, which facilitates the Replacement and Reduction principles of animal ethics. That is, other researchers will be able to use our data rather than acquiring new data in new animals.

REFERENCES

- Botvinick MM, Braver TS, Barch DM, Carter CS & Cohen JD. (2001) Conflict monitoring and cognitive control. *Psychol. Rev.* 108, 624–52.
- Courtière A, Hardouin J, Burle B, Vidal F, Hasbroucq T. (2007). Simon effect in the rat: a new model for studying the neural bases of the dual-route architecture. *Behav Brain Res.* 179(1):69-75.

Cohen MX (2014) A neural circuit for conflict detection and resolution. *Trends in Neurosciences* 37(9):480-90. Sept 25.

Dombrowski, SM, Hilgeta, CC, Barbas, H. (2001). Quantitative architecture distinguishes prefrontal cortical systems in the rhesus monkey *Cereb. Cortex*, (11) 975–988.

Hu H., Gan J., Jonas, P. (2014). Interneurons. Fast-spiking, parvalbumin \square GABAergic interneurons: from cellular design to microcircuit function. *Science*, 345, 1255263-1

Markram, H. Toledo-Rodriguez, M. Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., Wu, Caizhi (2004). Interneurons of the neocortical system. *Nature Reviews Neuroscience*. 5, 793-807.

Nieh EH, Kim SY, Namburi, P, Tye, KM (2013). Optogenetic dissection of neural circuits underlying emotional valence and motivated behaviors. *Brain Research* (1511) 73-92.

Pennartz CM, van Wingerden M., Vinck, M. (2011). Population coding and neural rhythmicity in the orbitofrontal cortex. *Annals NY Academy of Science*, (1239), 149-161.

Pi, HJ, Hangya, B, Kvitsiani, D, Sanders, JI, Huang, ZJ, Kepecs A. (2013). Cortical interneurons that specialize in disinhibitory control. *Nature*. (503) 521-524.

Ridderinkhof, K. R., Ullsperger, M., Crone, E. A. & Nieuwenhuis, S. (2004) The role of the medial frontal cortex in cognitive control. *Science* 306, 443–7.

Urban-Ciecko, J., Barth, AL (2016). Somatostatin-expressing neurons in cortical networks. *Nature Reviews Neuroscience*. (17) 401-409.

Wang Y., Markram H, Goodman PH, Berger TK, Ma J & Goldman-Rakic, PG. (2006) Heterogeneity in the pyramidal network of the medial prefrontal cortex. *Nature Neurosci.*, (9) 534–542

Walton ME, Bannerman DM, Rushworth MF. (2002) The role of rat medial frontal cortex in effort-based decision making. *J Neurosci.*;22(24):10996-1003.

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 primary purposes of this research are:

(1) Determine the roles of three interneuron classes (PVB, SOM, VIP) and pyramidal cells on local neural oscillations in the executive functioning network, and on long-range information transfer between sensory processing regions and the executive functioning network. This goal will be achieved by applying brief pulses of electrical microstimulation pulses to one region while simultaneously measuring neural activity from the same region and from other regions. Furthermore, we will use optogenetics to identify and silence/activate different neuron classes while measuring neural activity using electrophysiology and calcium imaging (for this purpose, small electrodes or imaging lenses will be placed in the executive functioning network including the prefrontal cortex and striatum, and sensory-processing regions including V1 and S1). Recordings will take place during learning and spontaneous ("resting-state") activity. We will use different temporal patterns of microstimulation (varying from single pulses to 100 Hz) to determine frequency resonance responses while using optogenetics to suppress the different neuron classes. We expect to find region- and neuron subtype-specific coupling. The frequency specificity of the results will provide important information into the speed with which information can be transferred across different brain circuits, and how information transfer at different frequencies depends on specific types of interneurons.

(2) Determine the roles of these neuron classes in learning and decision-making in the executive functioning network. This goal will be achieved by having mice learn that some sensory stimuli are associated with rewards while others are not, while neuron classes are optogenetically inhibited or phasically activated during or after stimulus presentation. Brain activity will be monitored simultaneously using electrophysiology or calcium imaging. Neural activity will be recorded continuously, across different phases of learning (before and after learning has taken place), which will allow us to identify the specific roles of neuron classes in learning-related changes in neural activity and inter-regional synchronization. Furthermore, we will use novel stimuli when animals have learned the correct stimulus-reward associations, which will allow us to have a sufficient number of repetitions (trials) to study changes in neural activity during the learning process. We expect to find that synchronization between sensory-processing regions and the executive function network will enhance with learning, and will depend on specific interneuron subtypes. For example, we expect SOM cells to be more involved in slower synchronization while PVB cells are more involved in faster synchronization. For this goal, it is also important to test learning in different sensory modalities (visual, auditory, whisker) in order to determine the modality-specific vs. modality-general features of synchronization with the executive functioning network.

Feasibility of the research

This research is highly feasible. We will utilize neuroscience techniques that have been developed over the past decade and that are currently being used at our research institute. The novelty and importance of this research comes from the innovative application of existing techniques to answer unknown questions. Furthermore, the research is developed with the 3 R's in mind; sophisticated experimental techniques will reduce discomfort of the animals while simultaneously increasing the amount of data obtained from each animal.

The research proposed here will be completed by a team of scientists who have previous experience using electrophysiology and optogenetics. Over the next 5 years, there will be several experienced scientists involved in the research, including 3-4 postdocs, 1-2 PhD students, and a full-time animal technician with 9 years experience. The proposed research will also benefit from close collaborations within the Radboud/Donders community. The PI has also written an authoritative textbook on neuroscience data analyses and statistics.

A large portion of this research is funded by an ERC Starting grant. The purpose of the grant is to make new discoveries regarding the neurobiological origin and functional significance of neural oscillations in the medial prefrontal cortex during executive functioning, and their relationship to EEG signals. This research is also supported by internal funds from the University Medical Center and by NWO grants (e.g., Veni).

3.3 Relevance

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

Scientific relevance:

There is overwhelming evidence that the executive functioning network is critically important for healthy brain function and for learning associations between sensory information and rewards. But there is too little understanding of the microcircuit dynamics that support these aspects of cognition, in particular, the roles of different molecularly-identifiable classes of neurons that control neural oscillations involved in executive functioning. The findings obtained in this research will be significant for researchers of human EEG and cognition, and for researchers of animals and computational models. A second scientific impact is that >10 TB of rich, high-quality neurophysiology data will be available to the scientific community, maximizing the knowledge gained from our data, and thus also reducing the number of animals that need to be used to obtain such data in the future.

Clinical relevance:

Dysfunction of executive control is implicated in many clinical disorders, ranging from mood disorders (obsessive compulsive disorder, major depression) to motor diseases (Parkinson's disease) to schizophrenia and addiction. It is known that these conditions are associated with aberrant patterns of neural activity and synchronization, but it is less clear what those patterns mean at the neural and circuit level, due to limitations of non-invasive neuroimaging in humans.

On the other hand, medications that are associated with improved executive functioning also alter patterns of neural synchronization. Using rodent models to understand basic brain functioning in the executive network will provide a foundation for understanding how these networks are affected by disease models, and how efficacious medication improves functioning in these neural circuits.

Societal relevance:

Executive functioning is broadly relevant for many aspects of success in our world, ranging from social situations to work promotions to driving a car. The research described here will help understand how these functions are implemented in the brain, which is a necessary step towards understanding how these dysregulation in executive functioning contributes to neural disorders. In summary, the scientific, clinical, and societal significance of our research outweighs the potential discomfort the animals may experience.

3.4 Research Strategy

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

Our research strategy involves the following three phases, with associated go-nogo decision points:

1. Surgeries to implant electrodes and inject viruses. Surgery must take place over two sessions due to limitations of the viral injection in the biosafety hood. The first surgery will involve injecting viruses and will last 1-4 hours. This surgery is necessary to allow us to control the activity of subclasses of neurons. This will provide the key experiment feature that allows us to establish causal relationships between neuron types, neural synchronization, and EEG.

The second surgery will take place 1-3 weeks later, will involve implanting electrodes and/or optimal imaging lens, and will last 5-9 hours, depending on the complexity of the surgery. We use state-of-the-art electrodes that maximize the amount of data while minimizing the size of the probes. Each probe is 15-50 microns thick, is very flexible, and is lowered into the brain slowly. These features minimize tissue damage. The lens for optical imaging is placed on top of the brain, under the skull. Some pressure against brain tissue is required to ensure a tight fit with minimal possibility of infection. For this reason, the lens cannot be placed on top of blood vessels.

Go-nogo decision point: Not all animals can be implanted with a lens for optical imaging. Approximately 40% of mice have blood vessel organization under the skull that prevents the safe implantation of a lens (see also DAP, section 2A). Initial screening is performed to examine local vasculature (following established procedures by Low et al., 2014); animals that have veins overlying target brain regions will receive electrodes and not imaging lenses. (Electrode implantation requires only very small burrholes in the skull and it is easy to avoid blood vessels.)

2. Recording sessions that involve brief pulses of electrical or optogenetic microstimulation, during continuous monitoring of brain electrical and neural activity using electrodes and/or optical imaging. This second part lasts no longer than 10 months or shorter if humane endpoints are reached. This part of the research will provide the data that will be analyzed off-line. The analyses are described in more detail in the Animal Procedures section. Briefly, we will focus on identifying the roles of different subclasses of neurons in oscillations and inter-regional synchronization, with a particular focus on the medial prefrontal cortex and its interactions with striatal and sensory-processing regions. Some experiments involve stimulus-reward associations; others involve resting state (no task).

Go-nogo decision point: If animals lose weight or exhibit other signs or disease or discomfort, or if humane endpoints are reached, the experiment will immediately be stopped (see section H3 for more details). Individual recording sessions will end immediately when there are signs of stress or discomfort, or lack of motivation (e.g., no longer licking for rewards), or after 90 minutes.

3. Euthanasia and ex-vivo anatomical confirmation of electrode implantation and viral expression. This third part ends the research for the animal.

Each animal will undergo the same three procedures in the same order. Differences across animals arise in the specific configuration of electrodes and learning tasks, which are implemented to target different brain regions. However, these specific aspects do not change the overall flow or the strategy of the research, nor do they affect the amount of discomfort. Thus, from an ethics perspective and considering the animals' welfare, the entire research can be considered as one experiment protocol.

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.

Phase 1: Surgery

Surgery is performed to implant electrodes, light fibers, and inject viruses to measure and modulate brain activity. The first surgery takes place in the biosafety cabinet and involves using a human-controlled robotic stereotaxis to inject the virus. Due to space and time constraints of the biosafety cabinet, the second surgery to implant the electrodes/lens will take place in a separate session outside the biosafety cabinet.

Electrodes will be implanted to record neural activity from several distinct neural circuits simultaneously. Depending on the target regions, 1-4 electrodes will be implanted into the brain. In order to establish causal mechanisms, we will also provide brief stimulation using optical or electrical tools. For this purpose, a light fiber is implanted that will be connected to a light source during the experiment. After implantation, the electrodes and fibers are secured to the skull using a combination of skull screws, cement, and other adhesive materials. This allows for chronic recordings for weeks to months, maximizing the amount of data generated per animal and minimizing the total numbers of animals utilized. After recovery, there is no physical pain or discomfort associated with the implantation. We use custom-designed materials that are 3D-printed to be very strong and yet very light.

Phase 2: Tasks and recordings

Adult mice will be tested in different situations during awake head-fixation. The use of chronic non-anesthetized animals is a strong advantage because it minimizes discomfort and produces a very large amount of data from each individual. Animals can be tested up to five days per week for up to 90 minutes per day (less time if there are signs of discomfort). In practice there are typically fewer measurements due to scheduling,

equipment availability, possible delays due to technical difficulties or building renovations, or when the animal is stressed or unmotivated to participate. The maximum will be reached only if the equipment is available and if the animal is sufficiently motivated and healthy. The total number of recording sessions is based on the amount of data required to obtain suitable statistically sound results. Having too little data would prevent us from drawing reliable scientific conclusions. This is described in more detail in a later section. Brain activity is recorded continuously during the testing sessions. Cameras and breathing monitors are available to allow behavior and physiology to be monitored for signs of distress.

Behavioral tasks are similar in that they involve learning stimulus-reward associations and behavioral responses to indicate choices. Differences among tasks are designed to focus on different aspects of learning and associated neural circuitry, and are described in more detail in the Procedures section. Water and/or food scheduling is used to facilitate training and motivation during the behavioral tasks. Frequent liquid rewards are given during the tasks, and ad libitum after recording sessions. We take special care regarding the amount of food/water scheduling -- animals should be motivated to perform the experiments, but they should not be stressed or unhealthy. Healthy animals provide high-quality data, and this is obviously something we want to achieve.

Phase 3: Euthanasia and post-experiment anatomical confirmation

This is necessary to check the anatomical location of the implantations and expression of the virus (for optogenetics).

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 phases of the research (surgery, recordings, euthanasia) are necessarily highly related. There is no point in doing surgery if there are no tasks to record data, and we cannot record neural activity during behavior without first performing surgery to implant the electrodes. The procedures we will use reflect the current state-of-the-art in neuroscience. We wish to understand the neural circuit mechanisms of executive functioning and control over sensory processing, and large-scale electrophysiology and interference with optogenetic/electrical microstimulation are currently the best tools for this. This is fundamental research that is necessary in order for future research to use rodents as models for studying diseases of human executive functioning.

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 | Description of procedures for surgery and tasks. |

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'. | 10300 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen | |
| 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 Description of procedures for surgery and tasks. |

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.

METHODS TO MEASURE BRAIN ACTIVITY, AND PRIMARY OUTCOME MEASURES

Electrophysiology: In-vivo electrophysiology is a technique that allows us to monitor ongoing brain activity in real-time during awake behavior or sleep. We implant 1-4 very thin probes into the brain that have dozens to hundreds of tiny electrodes. Each electrode acts as an antenna to record the activity of individual brain cells, as well as the local field potential (the aggregated activity over hundreds of cells). Placing electrodes in different parts of the brain also allows us to measure the interactions across brain regions, which are believed to be of central importance to brain functions like perception, memory, and thinking. Primary outcome measures: action potentials from individual neurons, local field potentials

EEG: EEG is one of the primary brain imaging methods in humans. However, EEG measures only aggregated activity summed over millions of neurons. One of the themes of our research is to understand the origin and significance of EEG. Thus, skull EEG will be measured alongside the electrophysiology. From a practical and welfare perspective, EEG adds no discomfort—the setup already requires 4-10 metal skull mounts that secure the headstage; we will simply attach wires to use as electrodes. Primary outcome measure: EEG activity (oscillations in different frequency bands)

Calcium imaging: Calcium imaging is a technique in which a lens is chronically implanted in or on the brain. During recording sessions, the lens is connected to a camera. The camera images fluorescence that is given off by activation of calcium channels, one of the key currents in active neurons. AAV viruses in combination with Cre driver lines provide these fluorescence proteins only to neurons that have a specific molecular marker, such as somatostatin for SOM interneurons. This technique therefore allows us to measure the activity of several dozens of individual cells simultaneously and reliably over time. The use of calcium imaging lenses in the medial prefrontal cortex is well established (Low et al., 2014) and used by many neuroscience research groups in the world, including the Netherlands. Primary outcome measure: activity of cells identified in images

METHODS TO CAUSALLY PROBE BRAIN ACTIVITY

Optogenetics: “Optogenetics” refers to the use of light (via lasers or LEDs) to identify or control specific components of biology. In neuroscience, optogenetics is used to understand how specific subclasses of brain cells contribute to larger neural circuits and to behavior. Optogenetics involves two steps. The first step is to inject an agent that causes the expression of channelrhodopsin (or other type of opsin), a light-sensitive ion channel, in neurons that have a particular genetic signature. After a few weeks, the opsin is expressed and a light fiber can be used to control ion channels in those particular cells.

Electrical microstimulation: Electrical microstimulation involves brief (<1 ms) pulses of electrical current between two neighboring electrodes. These currents activate cell bodies and projecting axons that propagate a volley of neural activity to downstream regions. This technique has been used for decades in neuroscience. We will use electrical microstimulation as a way to measure inter-regional information transfer and synchronization. For example, we can provide a pulse of stimulation to the thalamus while recording from the medial prefrontal cortex. Then, we will use optogenetics to silence or activate specific interneuron types and quantify the change in electrical potential. Stimulation will be titrated per animal to be the lowest

amount of stimulation required to elicit a response; the goal is not to elicit an overt behavioral response, but rather to probe inter-regional connectivity.

REFERENCES

Low RJ, Gu, Y., Tank, DW (2014). Cellular resolution optical access to brain regions in fissures: Imaging medial prefrontal cortex and grid cells in entorhinal cortex. PNAS, (111) 18739–18744.

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

All animals will undergo the same three phases of the experiment, in the same order (1-surgery, 2-recordings, 3-euthanasia). All experiments have a similar approach; differences are related to the location of implantations, sensory stimuli, and stimulation parameters.

Phase 1: Surgery

Surgery is performed to implant electrodes and inject viruses to measure and influence brain activity. We follow standard established protocols that increase scientific benefit and precision, while minimizing discomfort. Surgery is performed on healthy animals. Inhalant anesthesia is provided, and body temperature and respiration are continuously monitored during surgery. Animals will receive both pre- and post-operative analgesia and to minimize pain. Animals are checked frequently after surgery for signs of distress or sickness (e.g., eating and grooming habits, fur quality, etc.).

Because of viral injections, surgeries take place in a class-II biosafety cabinet. This necessitates performing two surgeries, one for viral injections inside the biosafety cabinet, and a second surgery 1-3 weeks later for implanting electrodes and/or lens. Depending on the target, we will use either replication-defective Adeno Associated viruses (AAV)/CAV2/G-deleted or concentrated replication-incompetent, self-inactivating lentivirus. Different viruses are used to target different subclasses of cells, but none of the viruses are associated with any discomfort, behavioral impairments, or bodily harm. Instead, the virus causes the production of opsins in neurons that allow us to provide microstimulation to briefly excite or inhibit those neurons.

State-of-the-art electrodes will be implanted to record the activities of several dozens of neurons and neural circuits simultaneously. Improved electrode technology allows for smaller and thinner probes (meaning less damage to the brain as the electrode is implanted). Depending on the experiment protocol, electrodes will be implanted into the cortex or subcortical structures. Surgical implantation is done via digitally controlled manipulator arms that provide very high targeting precision, based on standardized brain atlases.

After implantation, the electrodes and fibers are secured to the skull. This allows chronic recordings for up to a maximum of 10 months, or less if humane endpoints are reached, maximizing the amount of data generated per animal and minimizing the total numbers of animals utilized. Electrodes and optical fiber are secured to a headpost, which is like a cap that is secured to the skull via screws and bone cement. The headpost is 3D-printed to be strong yet light. Animals quickly adjust to the presence of the headpost and are not impeded by it during daily activities. We have gained considerable expertise at designing and implanting these devices, and are confident that it causes minimal discomfort while maximizing scientific benefit. We use special-designed cages that are taller to prevent the headpost from accidentally hitting the top part of the cage. Cages include enrichment and nesting material.

Recovery time from each surgery is typically 3-5 days.

Selecting animals for imaging or electrophysiology

The calcium imaging experiments involve implanting a lens in an opening in the skull. For this procedure to be safe, there cannot be large veins near the target site (otherwise we risk damaging the brain's blood supply, which can be fatal). We will follow the following established procedure (reported by Low et al., 2014): Each animal will be screened by skull-thinning to examine the local vasculature. Approximately 40% of animals have bridging veins that would prevent safe implantation of the lens; these animals will not be used for imaging and instead will be used only for electrophysiology studies (the electrophysiology surgery involves only very small burrholes in the skull; veins are easily avoided). This decision is made at the start of the surgery, in order to minimize the number of surgeries that are necessary.

Phase 2: Tasks and recordings

Mice will be tested in awake head-fixation during behavior tasks and resting-state (spontaneous recordings). The use of chronic non-anesthetized animals is a strong advantage because it minimizes discomfort and produces a very large amount of data from each individual. Animals can be tested up to five days per week for up to 90 minutes per day (less time if there are signs of discomfort). These are theoretical maximum possible recording durations; in practice, scheduling, equipment availability, and animals' motivation limit the actual number and duration of recordings. Brain electrical activity is recorded continuously during the testing sessions. In addition, cameras and breathing monitors can be made available for behavior and physiology to be monitored.

Each experiment will include 12 animals per group. A statistical justification for this number is provided in the next section. Some behavioral training will begin prior to surgery to familiarize the mice to the experimental setup and stimuli. Head fixation is gradually introduced through handling and rewards, following standard procedures used at many universities and neuroscience research institutes.

Reward learning task (three sensory modalities [visual, auditory, and whisker] in five groups [SOM, PVB, VIP, Pyr-deep, Pyr-super] and for two imaging methods [imaging, electrophysiology-only]). The purpose of these tasks is to investigate the local and long-range neural circuitry underlying reward learning-related interactions between the executive functioning network and sensory processing regions. Mice will undergo operant reward conditioning. Stimuli of different modalities (visual, auditory, whisker) will be paired with liquid rewards, while other stimuli will not be paired with rewards. Licking spouts will be available to indicate behavioral responses. Optogenetic silencing will take place during or after sensory stimuli or rewards are delivered.

Mice will also undergo "resting tasks," in which no specific behaviors are required. These recordings provide an important comparison condition for the task-related dynamics as well as the opportunity to make more detailed assessments of the roles of interneurons in synchronization.

Our calculations indicate that we will need approximately 40 hours of recordings per animal. This is based on the anticipated number of stimulation frequencies and repetitions (e.g., 100 frequencies X 100 trials X 10 seconds per trial \sim 30 hours), and learning conditions. This cannot be done in a single session, therefore the sessions are spread out over time. Assuming \sim 30 minutes of recordings per session and \sim 3 sessions per week (although it is possible to have longer sessions, these are realistic numbers based on scheduling and availability of shared equipment), we anticipate requiring 7 months per animal (including peri-surgery adjustment, recuperation, and training). On the other hand, there are occasional delays in the institute that are outside of our control, and it is sometimes necessary to pause data collection for days or weeks at a time. Therefore, we allow a

potential maximum of up to 10 months for data collection. We stress that these are the maximum possible limits; in practice, data collection will not take the maximum amount of time.

Description of experiment outline for a single animal

To help clarify what will happen in the experiment, we here describe an example of the procedure for a single animal (the experience for all animals is similar, with differences due to sensory modalities, genotype, and so on). At the start of a recording session, the animal will be placed into the head-fixation on a styrofoam ball inside the dome. By this point, the animal has had considerable experience being handled by the researcher and is familiar with the setup. Furthermore, the animal has learned that the experiment provides liquid rewards. This step is therefore not associated with significant discomfort. Attaching the electrode and fiber from the animal to the equipment takes a few minutes, and then the recordings begin. During the learning task, large and easily discriminable visual objects will appear on the screen (for example, a circle or a triangle). Liquid rewards will accompany one stimulus but not the other stimulus. The reward is available via a dispenser placed close to the mouse's mouth. The mouse simply has to lick to retrieve the reward (we record these licks using sensitive piezos; this provides behavioral evidence of learning). Within a few minutes, the animal learns that one stimulus predicts a reward while the other doesn't. We will test the hypothesis that this learning is accompanied by increases in synchronization between sensory areas and prefrontal/striatal areas. In some conditions, we will use the light fiber to inhibit the activity of molecularly defined interneurons, in order determine their contribution to learning and neural synchronization. Because of the simplicity of the task, the animal will learn the stimulus-reward association within a few minutes; for this reason, different recording sessions will use different stimuli (for example, circles and triangles, or squares and diamonds; complex pictures are also used when they are easily discriminable and matched for low-level visual features). The animal will need to learn new associations each time, which allows us to investigate the learning process over repeated trials.

During the passive "resting tasks" used for stimulation, the animal will remain in the setup but will not perform a task. We will apply brief pulses of electrical stimulation to induce activity, while using the light fiber to inhibit the activity of interneuron populations. This will provide detailed information regarding the contribution of interneuron types to local and inter-regional synchronization. The advantage of these recordings is that we have better control over the patterns of synchronization compared to the endogenous dynamics that appear during learning. The stimulation levels are too low to produce any observable behavioral response, and thus we do not anticipate that the animal will experience discomfort resulting from this stimulation. Animals will receive occasional liquid rewards to maintain their motivation level.

The recording session described above ends (1) after a maximum of 90 minutes, (2) depending on equipment scheduling, or (3) the animal is not motivated to continue. Signs of this latter case include struggling or lack of interest in the liquid rewards. In any of these cases, the animal is immediately removed from the setup and returned to the home cage.

Electrical and optogenetic stimulation

Stimulation is necessary to establish causality. For example, we hypothesize that the mediodorsal thalamus acts as a gate for sensory information to enter the medial prefrontal cortex. We therefore expect that silencing the thalamus will cause a reduction of medial prefrontal theta oscillations. This is a crucial aspect of the research and it is not possible to test these hypotheses using alternative methods.

Electrical microstimulation has been the standard method for transiently perturbing neural networks. Although it is temporally and spatially precise, it lacks any cell-type specificity because it activates all neurons within the current field, and therefore is not very physiologically realistic.

Optogenetic stimulation is equally temporally and spatially precise but also has very high cell-type specificity. It also allows for inhibition, which is not possible with electrical stimulation. But it is also a new technique. We need to compare it to electrical microstimulation in order to determine their differences and to facilitate comparison to the existing literature. Furthermore, combined electrical and optogenetic stimulation gives additional flexibility for investigating 3-way network interactions (e.g., using optogenetics to silence SOM interneurons in the medial prefrontal cortex while providing electrical microstimulation to the thalamus).

Phase 3: Euthanasia and post-experiment anatomical confirmation

To achieve interpretable results, it is important that all animals remain healthy and show no signs of stress or reduced well being during all experimental procedures. Indeed, only healthy animals can provide the best quality data. Animals will be checked daily for any signs of sickness. Humane endpoints of the research are reached by overt signs of sickness, loss of body weight (more than 15%) or other indications of reduced well being.

If discomfort levels appear to be unusually high (immobility, refraining from drinking or eating, pale color of eyes and skin), the animal will be euthanized and a post-mortem examination will be performed with the aim of understanding possible causes and potentially further refining our procedures.

Euthanasia will be performed with an injection of pentobarbital in isoflurane anesthetized animals. After carefully checking the level of anesthesia (absence of tail-pinch reflex), perfusion with paraformaldehyde will be completed in order to remove and section the brain for histological verification of electrodes and fiber placements, and viral expression.

Pilots

It is important to optimize our surgical and experimental techniques. This will improve the scientific quality of the data as well as minimizing discomfort for the animals. We therefore request an additional 35 (WT) animals for piloting (15 for behavioral task piloting, and 20 for surgery piloting). These will be used to test surgical procedures and ensure that the tasks are sufficiently well-designed.

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

STATISTICS FOR NEURAL DATA

For the neural data, we focus on time-frequency-based analyses of oscillations, synchronization, and spike-field coherence. The primary PI involved in this research is an expert in these kinds of data analyses, as exemplified by his 600-page textbook on neuroscience data analyses and statistics [REDACTED]. Each animal will provide many thousands of trials of data, ensuring a large probability of high-statistical-power results. Statistical analyses vary depending on the specific analysis, but mostly involve either (1) non-parametric permutation-based testing or (2) parametric test such as ANOVAs or multiple regressions. Multiple comparisons issues are addressed using: (1) cluster- or maximum-pixel correction for time-frequency-space analyses; (2) Bonferroni correction across groups; (3) split-half replication, in which all analyses are performed on 50% of the data, and the findings are confirmed in the other 50% of the data. Statistics and multiple comparisons corrections will follow standard procedures in neuroscience (Maris and Oostenveld, 2007).

Most of our analyses will focus on changes in neural activity before vs. after brief pulses of stimulation and sensory/reward stimuli. We will compare action potentials, local field potential signals in different frequency bands, EEG activity, and inter-regional synchronization.

CALCULATION OF THE NUMBER OF ANIMALS PER GROUP

Having a sufficient sample size is crucial in neuroscience experiments (Button et al., 2013; Nieuwenhuis et al., 2011). In total, we will utilize 12 animals per group. This number is derived from power analyses of previous literature. For example, the effect sizes from one study using similar analyses (van Wingerden et al., 2014) suggests that 11 animals is sufficient for a power of $\beta=.8$ and $\alpha=.05$. Having 12 animals also provides some buffer in case we need to exclude data if a few animals are not able to complete the tasks, if there are technical problems, or if humane endpoints are reached.

On the other hand, we acknowledge that because of the novelty of our analyses, appropriate sample sizes are not known for all of our analyses. We will closely monitor our results, and if pilot testing reveals that 12 animals per group is more than sufficient, fewer animals may be used.

REFERENCES

Button KS, Ioannidis JP, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ES, Munafò MR. (2013). Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci.* 2013 May;14(5):365-76.

Maris E., Oostenveld, R. (2007). Nonparametric statistical testing of EEG- and MEG-data. *J Neuroscience Methods.* (164) 177-190.

Nieuwenhuis S, Forstmann BU, Wagenmakers EJ. (2011). Erroneous analyses of interactions in neuroscience: a problem of significance. *Nat Neurosci.* 2011 Aug 26;14(9):1105-7.

van Wingerden M, van der Meij R, Kalenscher T, Maris E, Pennartz CM. (2014). Phase-amplitude coupling in rat orbitofrontal cortex discriminates between correct and incorrect decisions during associative learning. *J Neurosci.* 2014 Jan 8;34(2):493-505.

B. The animals

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

We will use six types of mice. Five types are so-called Cre-driver line mice, meaning that they are genetic lines that express Cre-recombinase in molecularly identified neuron subclasses. This allows us to target specific subclasses of neurons. In the previous sections we outlined the justification of animal numbers for each experiment. The sixth group is WT animals that are used for piloting and optimizing surgical and experimental techniques. We will use males and females.

None of the gene lines we will use are associated with physiological impairments or genetic-caused distress or discomfort.

SOMcre, PVBcre, and VIPcre: These animals allow us to target somatostatin-positive, parvalbumin-positive, and vasoactive intestinal peptide-positive cells. As mentioned earlier, these cells are thought to make different contributions to neural computations. We will evaluate the roles of these interneuron types to network oscillations and reward learning.

PyrDeep, PyrSuper: These animals allow us to target excitatory pyramidal cells in the deep vs. superficial layers of the cortex. This is important because the different cortical layers subserve different functional roles in network synchronization and cognition.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|--------------------|---------------------|---------------------------|------------|
| Mouse (SOMcre) | Own breeding colony | 72 | Adult |
| Mouse (PBVpre) | Own breeding colony | 72 | Adult |
| Mouse (VIPcre) | Own breeding colony | 72 | Adult |
| Mouse (PYRdeep) | Own breeding colony | 72 | Adult |
| Mouse (PYRsuper) | Own breeding colony | 72 | Adult |
| Mouse (WT, pilots) | Own breeding colony | 35 | Adult |

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.

There are several large-scale efforts to develop accurate computational models of the brain or brain subsystems. Though promising, these models still require confirmation from empirical studies, and are not ready for use in scientific or clinical research. In our own research, we are working on a computational model of medial frontal cortex functioning that will be informed by this research. However, at present, the kinds of experiments discussed in this proposal are necessary to develop a better understanding of brain function. Thus, it is currently not possible to replace animal

models with computer simulations. Furthermore, lower animal species such as insects do not have sufficient cognitive capabilities or brain development to make them valid models for understanding cognitive function in humans. Rodents share several cognitive functions with humans, including sensory decision-making and working memory. Furthermore, the availability of Cre driver lines is a strong argument in favor of using mice, because these lines allow us to investigate the contributions of specific subclasses of neurons to neural and cognitive functions.

The primary measurement techniques used here -- invasive electrophysiology and optical imaging -- are generally not available in humans. There are some clinical situations in which subdural electrodes are placed (e.g., epilepsy or deep-brain-stimulation), but these recordings are generally made from unhealthy tissue, these patients are rare and difficult to access, and the recordings often do not include activity from individual cells. Thus, rodents are necessary and at present cannot be replaced by another species.

Reduction.

Our experiments are designed with the minimal number of animals needed to answer the research questions, while having a sufficient number of animals for high statistical power. As mentioned earlier, there are two important components of our research that work towards reduction of the number of animals that will be tested. First, we obtain high-density multisite chronic recordings from each animal. This sharply reduces the number of animals we need to test to obtain sufficient data. Second, we will make all of our collected data publicly available for other scientists to download and use. This reduces the number of animals tested by other research groups around the world, because several hypotheses can be tested in our data, rather than having to collect new data.

Refinement.

All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep the discomfort for the animals as low as possible. We believe that only healthy animals with minimal stress can provide the high-quality scientific data that we seek. Therefore, we are highly motivated to refine our procedures as best as possible. The procedures and models we use in this proposal are described in literature to give reliable data. Furthermore, we are continuously monitoring and discussing our procedures to minimize discomfort and improve the health and well-being of the animals. A few specific examples are listed below (see also section H3).

- Recent innovations in 3D printing technology now allow us to use lighter and smaller head-mounted electrode holders.
- We have discovered that mice appear more comfortable by making specific adjustments to the head-fixation device (e.g., its angle relative to the floor surface).
- We begin animal handling prior to surgery so that animals are used to human interactions prior to physical discomfort; this reduces stress when being handled after surgery.
- Animals are provided supervised "social play time," in which they can interact with their peers in a cage for 10-30 minutes. Interactions must be supervised by researchers to prevent other animals from damaging the headstages. In addition to reducing overall stress and discomfort, play-time acts as another motivator for animals to perform the tasks and remain calm during testing sessions.

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

Our procedures are guided by strong considerations for the welfare of the animals. Unhealthy or stressed animals provide bad data, and it is thus obvious from both scientific and welfare perspectives that the animals must be kept as healthy and comfortable as possible. Furthermore, we

continuously seek to improve our procedures, and this topic is often discussed in group meetings. Section H3 details sources of discomfort and how we will seek to minimize or mitigate them. A few specific examples of how we strive to minimize discomfort were provided in the previous section.

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.

Non-applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Following is a list of components of the research that may cause discomfort, and how we will minimize discomfort.

Initial arrival. After arrival or transfer from the breeding facility, animals will be allowed to adapt to the animal facility for at least 7 days. They will be regularly weighed and checked for general health. All animals will be handled to familiarize them to the experimenter and the experimental procedures. Cage enrichment is available.

Surgical implantation of electrodes and viruses. Animals will be weighed and anesthetized with isoflurane (4-5% for induction, reduced during surgery) according to standard protocol. During surgery, animals will be placed on a heating pad and their heart rate and blood oxygenation levels will be monitored continuously. After thorough cleaning of the skin surface, lidocaine (2-4%) will be injected locally around the incision site. Surgery is performed while the animal is under isoflurane-maintained anesthesia.

NaCl will be given subcutaneously to keep the mice hydrated as needed. Carprofen is administered at least 30 minutes prior to the end of surgery, at 5 mg/kg bodyweight. Animals will be kept under observation at 30C, and moved to their cage after approximately after 1 hour where they will have free access to food and water post-surgery. 24 hours after surgery animals are given carprofen. During one week after surgery their behavior, appearance, and weight are monitored closely, once per day (or more frequently if necessary).

Post-surgical procedures. Animals will receive carprofen (s.c.) after surgery as an analgesic. We will also use buprenorphine (in saline s.c.) if the animal is visibly in pain. This will be repeated 24 hours later and again 48 hours later. Saline (at body temperature) will be administered s.c. to prevent dehydration as needed. A heating pad will be placed under the recovery cage to further facilitate post-anesthesia recovery, and will be closely monitored until fully recovered from anesthesia. Once awake, rodents will be placed in their home cage in an independently ventilated cage

(IVC) located in a DM-II room for a 2-week quarantine period. After said period, animals may be considered virus free and returned to conventional lab space. Animals will be weighed and checked for general health and recovery from surgery (wound recovery, mobility, etc.) daily for minimum of 3 consecutive days, but typically 5 days, until they regain their pre-operative weight. Animals that do not adequately recover from surgery and show reduced signs of well-being (loss of more than 15% of pre-operative body weight) will be euthanized in accordance with humane end points. Several research groups at the institute have extensive experience with these general stereotaxic techniques and have developed a highly standardized protocol for both the surgical procedures as well as pre-, peri- and post-operative care. Animal welfare logbooks will be kept. Rodents will be allowed to fully recover before commencement of the experiment procedures.

Housing. Single housing is necessary for this research because of the headpost that is attached to the head. Other mice may bite or scratch at this construction, which would cause damage and could lead to infection or death. However, single housing can cause moderate discomfort for mice, because they are social animals. All cages are kept in close proximity, meaning animals can see, hear, and smell each other. Animals are checked daily for signs of sickness or stress, and are frequently weighed (typically, daily). Cages include enrichment and nesting materials. No shelters are not included to avoid damaging the headpost.

We will provide "supervised play-time" for the animals. This means putting animals together in the same cage to engage in social interactions, for periods of 10-30 minutes. Researcher/caretaker supervision is necessary to make sure the animals are not damaging each other's implants (this could cause irritation or infection). This play-time reduces stress and, when offered after training/experiment sessions, provides a natural motivator for good behavior during the recordings.

Food and water scheduling. Water or food scheduling is necessary to keep animals motivated to learn and perform the tasks. In general, we prefer water scheduling over food restriction for three reasons: It causes less discomfort, it is easier to regulate, and it has a faster time-course (animals get thirstier faster than they get hungry). Food restriction is used when water scheduling is insufficient. However, excessive restriction is neither necessary nor desirable. Animals will be kept at approximately 90% body weight during training and during early phases of the recordings, estimated through standard growth curves (e.g., through information from Jax). If weight drops below 85%, ad libitum food and water are provided until they return to normal weight. Restriction becomes less necessary as the animals are familiarized and trained on the task.

Behavioral tasks. The tasks are not associated with any direct discomfort (no punishments, shocks, or other aversive stimuli are used). All tasks involve some reward component (typically, liquid reward delivered through spouts). Recording sessions will last no longer than 90 minutes per day, or shorter if there are signs of stress or discomfort, for up to five days per week. Head-fixation causes discomfort, particularly in the beginning. Animals are introduced to head-fixation slowly and are given rewards like sucrose water, soy milk, and sweet yogurt. Within days to a few weeks, animals learn that the head-fixation is safe, is associated with rewards, and does not last very long.

Stimulation. Based on literature and our previous experience, focused brain stimulation techniques do not cause any noxious effects. The stimulation is titrated per animal to be as minimal as possible while producing a measurable effect.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

see H3

Explain why these effects may emerge.

see H3

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

H3

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 include overt signs of sickness or clinical discomfort (for example, dehydration, 15% weight loss in less than 2 days, or a decrease of 20% compared to the weight at start of the experiment). Other risks arise from errors or infections during surgery and implantations. Needless to say, each animal is important and we do our best to avoid unnecessary risks or infections. In our experience, humane endpoints resulting from experimenter or surgical errors in <5% of cases. In such events, discussions are held to determine the source of the incident and strategies to improve our techniques.

Indicate the likely incidence.

Based on previous research and our experience, we anticipate <5%.

K. Classification of severity of procedures

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

We expect that 95% of the animals will experience severe discomfort resulting from the surgery and recover from anesthesia, and from single-housing (animals are in continuous smell/sound range of each other, which mitigates this source of discomfort to some extent). Even in the exceptional situation of an infection (<5%), pain management drugs and timely application of the humane endpoints will prevent extreme discomfort. Animals used for behavior piloting will not undergo surgery or anesthesia, and may experience mild discomfort from food or water scheduling.

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.

It is necessary to confirm the expression of the virus and placement of the electrodes in post-mortem imaging of the brain.

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



5.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD103002017873

Bijlagen

2

Datum 17 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 17 februari 2017. Het gaat om uw project "Interneurons, oscillations, and learning". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002017873. 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:

17 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD103002017873

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
17 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017873

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 17 maart 2017
Geplande einddatum: 17 maart 2022
Titel project: Interneurons, oscillations, and learning
Titel niet-technische samenvatting: Neuronen, oscillaties, en leerprocessen
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Nijmegen
Datum: 17 februari 2017

Datum:
17 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017873



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Geert Grooteplein 29
Postbus 9101, [REDACTED]
6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD103002017873

Bijlagen

2

Datum 17 februari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 17 februari 2017

Vervaldatum: 19 maart 2017

Factuurnummer: 170873

Ordernummer: Kostenplaats en kostensoort: 040823-461220 [REDACTED]

projectnummer: 2016-0079 Verantwoordelijk onderzoeker: [REDACTED]

| Omschrijving | Bedrag |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002017873 | € 1035,00 |

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**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
AVD103002017873

Datum 27 februari 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 17 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Interneurons, oscillations, and learning" met aanvraagnummer AVD103002017873. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

De formulering 'kamer op de kop' zal door het algemene publiek niet in context geplaatst kunnen worden. Kunt u beschrijven hoe groot dit ongeveer is, en hoeveel last het dier er van zal hebben.

Bij de 3V's beschrijft u dat uw experimenten/ resultaten zullen zorgen dat er in de toekomst geen dierexperimenten uitgevoerd hoeven worden. Dit ligt buiten uw invloedssfeer en kan daarom niet op deze manier aan het algemeen publiek gecommuniceerd worden. Kunt u dit anders formuleren.

U beschrijft dat de dieren nooit vervelende of pijn prikkels krijgen. Dit is niet in overeenstemming met de water- en voedsel deprivatie die u beschrijft. Kunt u dit herformuleren?

U beschrijft dat de dieren matig ongerief zullen ondervinden. In de bijlage dierproeven beschrijft u dat 95% van de dieren ernstig ongerief zal ondervinden. Kunt u dit aanpassen?

Onduidelijkheden

In de bijlage Dierproeven heeft u bij F. aangekruist dat de huisvesting van de dieren niet afwijkt van bijlage III van de richtlijn. Door de individuele huisvesting is dit wel afwijkend van bijlage III. Kunt u dit aanpassen?

Datum:

27 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD103002017873

U heeft in de bijlage dierproeven beschreven onder punt K. dat 95% van de dieren ernstig ongerief zal ondervinden. Kunt u aangeven wat het ongerief van de overige 5% van de dieren zal zijn, en de bijlage aanpassen?

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

Bijlagen:

- Melding bijlagen
- Niet technische samenvatting



Melding bijlagen

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

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD103002017873

2 Bijlagen

Welke bijlagen stuurt u mee?

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

Projectvoorstel

Beschrijving Dierproeven

Niet-technische samenvatting

Melding Machtiging

Aanvraagformulier

.....

.....

.....

Datum:

27 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD103002017873

3 Ondertekening

Naam:

Datum: - -

Handtekening:

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

Datum - 27 februari 2017

Betreft - aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte Centrale Commissie Dierproeven,

Thank you for the evaluation of this proposal ("Interneurons, oscillations, and learning"; aanvraagnummer AVD103002017873). I was pleased to read the overall positive evaluation. The committee also noted a few points in the proposal that needed further clarification before a final decision could be made. I thank the committee for their time and efforts to ensure that this ethics proposal is complete. Below is a point-by-point response to the comments.

De formulering 'kamer op de kop' zal door het algemene publiek niet in context geplaatst kunnen worden. Kunt u beschrijven hoe groot dit ongeveer is, en hoeveel last het dier er van zal hebben.

Reply

The description of the recording chamber was reformulated. It is now referred to more concretely as elektroden aansluiting.

Bij de 3V's beschrijft u dat uw experimenten/ resultaten zullen zorgen dat er in de toekomst geen dierexperimenten uitgevoerd hoeven worden. Dit ligt buiten uw invloedssfeer en kan daarom niet op deze manier aan het algemeen publiek gecommuniceerd worden. Kunt u dit anders formuleren.

Reply

That is true. The meaning of the statement is that because we will make all of our data available to the scientific community, other scientists can re-use our data instead of collecting new data. But that on its own does not prevent other scientists from collecting new data. That claim was removed.

U beschrijft dat de dieren nooit vervelende of pijn prikkels krijgen. Dit is niet in overeenstemming met de water- en voedsel deprivatie die u beschrijft. Kunt u dit herformuleren?

Reply

That was indeed confusing. That statement referred to using only rewards and not shocks during the experiment, but indeed water and food restriction can be unpleasant. The statement ("De dieren krijgen nooit vervelende of pijn prikkels") was removed.

U beschrijft dat de dieren matig ongerief zullen ondervinden. In de bijlage dierproeven beschrijft u dat 95% van de dieren ernstig ongerief zal ondervinden. Kunt u dit aanpassen?

Reply

Apologies for the inconsistency. The NTS has been adjusted to reflect that the main application lists ernstig ongerief.

In de bijlage Dierproeven heeft u bij F. aangekruist dat de huisvesting van de dieren niet afwijkt van bijlage III van de richtlijn. Door de individuele huisvesting is dit wel afwijkend van bijlage III. Kunt u dit aanpassen?

Reply

“Yes” is now selected, and we provided a justification of the individual housing, which minimizes damage to the headpost and therefore minimizes the risk of infection or other complications.

U heeft in de bijlage dierproeven beschreven onder punt K. dat 95% van de dieren ernstig ongerief zal ondervinden. Kunt u aangeven wat het ongerief van de overige 5% van de dieren zal zijn, en de bijlage aanpassen?

Reply

This is now clarified: The other animals are from the pilot-testing group, who will experience mild discomfort resulting from handling and water/food restriction (behavioral task piloting), or from anesthesia induction (surgical piloting).

**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'. | 10300 | |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen | |
| 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 Description of procedures for surgery and tasks. |

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.

METHODS TO MEASURE BRAIN ACTIVITY, AND PRIMARY OUTCOME MEASURES

Electrophysiology: In-vivo electrophysiology is a technique that allows us to monitor ongoing brain activity in real-time during awake behavior or sleep. We implant 1-4 very thin probes into the brain that have dozens to hundreds of tiny electrodes. Each electrode acts as an antenna to record the activity of individual brain cells, as well as the local field potential (the aggregated activity over hundreds of cells). Placing electrodes in different parts of the brain also allows us to measure the interactions across brain regions, which are believed to be of central importance to brain functions like perception, memory, and thinking. Primary outcome measures: action potentials from individual neurons, local field potentials

EEG: EEG is one of the primary brain imaging methods in humans. However, EEG measures only aggregated activity summed over millions of neurons. One of the themes of our research is to understand the origin and significance of EEG. Thus, skull EEG will be measured alongside the electrophysiology. From a practical and welfare perspective, EEG adds no discomfort—the setup already requires 4-10 metal skull mounts that secure the headstage; we will simply attach wires to use as electrodes. Primary outcome measure: EEG activity (oscillations in different frequency bands)

Calcium imaging: Calcium imaging is a technique in which a lens is chronically implanted in or on the brain. During recording sessions, the lens is connected to a camera. The camera images fluorescence that is given off by activation of calcium channels, one of the key currents in active neurons. AAV viruses in combination with Cre driver lines provide these fluorescence proteins only to neurons that have a specific molecular marker, such as somatostatin for SOM interneurons. This technique therefore allows us to measure the activity of several dozens of individual cells simultaneously and reliably over time. The use of calcium imaging lenses in the medial prefrontal cortex is well established (Low et al., 2014) and used by many neuroscience research groups in the world, including the Netherlands. Primary outcome measure: activity of cells identified in images

METHODS TO CAUSALLY PROBE BRAIN ACTIVITY

Optogenetics: “Optogenetics” refers to the use of light (via lasers or LEDs) to identify or control specific components of biology. In neuroscience, optogenetics is used to understand how specific subclasses of brain cells contribute to larger neural circuits and to behavior. Optogenetics involves two steps. The first step is to inject an agent that causes the expression of channelrhodopsin (or other type of opsin), a light-sensitive ion channel, in neurons that have a particular genetic signature. After a few weeks, the opsin is expressed and a light fiber can be used to control ion channels in those particular cells.

Electrical microstimulation: Electrical microstimulation involves brief (<1 ms) pulses of electrical current between two neighboring electrodes. These currents activate cell bodies and projecting axons that propagate a volley of neural activity to downstream regions. This technique has been used for decades in neuroscience. We will use electrical microstimulation as a way to measure inter-regional information transfer and synchronization. For example, we can provide a pulse of stimulation to the thalamus while recording from the medial prefrontal cortex. Then, we will use optogenetics to silence or activate specific interneuron types and quantify the change in electrical potential. Stimulation will be titrated per animal to be the lowest

amount of stimulation required to elicit a response; the goal is not to elicit an overt behavioral response, but rather to probe inter-regional connectivity.

REFERENCES

Low RJ, Gu, Y., Tank, DW (2014). Cellular resolution optical access to brain regions in fissures: Imaging medial prefrontal cortex and grid cells in entorhinal cortex. PNAS, (111) 18739–18744.

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

All animals will undergo the same three phases of the experiment, in the same order (1-surgery, 2-recordings, 3-euthanasia). All experiments have a similar approach; differences are related to the location of implantations, sensory stimuli, and stimulation parameters.

Phase 1: Surgery

Surgery is performed to implant electrodes and inject viruses to measure and influence brain activity. We follow standard established protocols that increase scientific benefit and precision, while minimizing discomfort. Surgery is performed on healthy animals. Inhalant anesthesia is provided, and body temperature and respiration are continuously monitored during surgery. Animals will receive both pre- and post-operative analgesia and to minimize pain. Animals are checked frequently after surgery for signs of distress or sickness (e.g., eating and grooming habits, fur quality, etc.).

Because of viral injections, surgeries take place in a class-II biosafety cabinet. This necessitates performing two surgeries, one for viral injections inside the biosafety cabinet, and a second surgery 1-3 weeks later for implanting electrodes and/or lens. Depending on the target, we will use either replication-defective Adeno Associated viruses (AAV)/CAV2/G-deleted or concentrated replication-incompetent, self-inactivating lentivirus. Different viruses are used to target different subclasses of cells, but none of the viruses are associated with any discomfort, behavioral impairments, or bodily harm. Instead, the virus causes the production of opsins in neurons that allow us to provide microstimulation to briefly excite or inhibit those neurons.

State-of-the-art electrodes will be implanted to record the activities of several dozens of neurons and neural circuits simultaneously. Improved electrode technology allows for smaller and thinner probes (meaning less damage to the brain as the electrode is implanted). Depending on the experiment protocol, electrodes will be implanted into the cortex or subcortical structures. Surgical implantation is done via digitally controlled manipulator arms that provide very high targeting precision, based on standardized brain atlases.

After implantation, the electrodes and fibers are secured to the skull. This allows chronic recordings for up to a maximum of 10 months, or less if humane endpoints are reached, maximizing the amount of data generated per animal and minimizing the total numbers of animals utilized. Electrodes and optical fiber are secured to a headpost, which is like a cap that is secured to the skull via screws and bone cement. The headpost is 3D-printed to be strong yet light. Animals quickly adjust to the presence of the headpost and are not impeded by it during daily activities. We have gained considerable expertise at designing and implanting these devices, and are confident that it causes minimal discomfort while maximizing scientific benefit. We use special-designed cages that are taller to prevent the headpost from accidentally hitting the top part of the cage. Cages include enrichment and nesting material.

Recovery time from each surgery is typically 3-5 days.

Selecting animals for imaging or electrophysiology

The calcium imaging experiments involve implanting a lens in an opening in the skull. For this procedure to be safe, there cannot be large veins near the target site (otherwise we risk damaging the brain's blood supply, which can be fatal). We will follow the following established procedure (reported by Low et al., 2014): Each animal will be screened by skull-thinning to examine the local vasculature. Approximately 40% of animals have bridging veins that would prevent safe implantation of the lens; these animals will not be used for imaging and instead will be used only for electrophysiology studies (the electrophysiology surgery involves only very small burrholes in the skull; veins are easily avoided). This decision is made at the start of the surgery, in order to minimize the number of surgeries that are necessary.

Phase 2: Tasks and recordings

Mice will be tested in awake head-fixation during behavior tasks and resting-state (spontaneous recordings). The use of chronic non-anesthetized animals is a strong advantage because it minimizes discomfort and produces a very large amount of data from each individual. Animals can be tested up to five days per week for up to 90 minutes per day (less time if there are signs of discomfort). These are theoretical maximum possible recording durations; in practice, scheduling, equipment availability, and animals' motivation limit the actual number and duration of recordings. Brain electrical activity is recorded continuously during the testing sessions. In addition, cameras and breathing monitors can be made available for behavior and physiology to be monitored.

Each experiment will include 12 animals per group. A statistical justification for this number is provided in the next section. Some behavioral training will begin prior to surgery to familiarize the mice to the experimental setup and stimuli. Head fixation is gradually introduced through handling and rewards, following standard procedures used at many universities and neuroscience research institutes.

Reward learning task (three sensory modalities [visual, auditory, and whisker] in five groups [SOM, PVB, VIP, Pyr-deep, Pyr-super] and for two imaging methods [imaging, electrophysiology-only]). The purpose of these tasks is to investigate the local and long-range neural circuitry underlying reward learning-related interactions between the executive functioning network and sensory processing regions. Mice will undergo operant reward conditioning. Stimuli of different modalities (visual, auditory, whisker) will be paired with liquid rewards, while other stimuli will not be paired with rewards. Licking spouts will be available to indicate behavioral responses. Optogenetic silencing will take place during or after sensory stimuli or rewards are delivered.

Mice will also undergo "resting tasks," in which no specific behaviors are required. These recordings provide an important comparison condition for the task-related dynamics as well as the opportunity to make more detailed assessments of the roles of interneurons in synchronization.

Our calculations indicate that we will need approximately 40 hours of recordings per animal. This is based on the anticipated number of stimulation frequencies and repetitions (e.g., 100 frequencies X 100 trials X 10 seconds per trial \sim 30 hours), and learning conditions. This cannot be done in a single session, therefore the sessions are spread out over time. Assuming \sim 30 minutes of recordings per session and \sim 3 sessions per week (although it is possible to have longer sessions, these are realistic numbers based on scheduling and availability of shared equipment), we anticipate requiring 7 months per animal (including peri-surgery adjustment, recuperation, and training). On the other hand, there are occasional delays in the institute that are outside of our control, and it is sometimes necessary to pause data collection for days or weeks at a time. Therefore, we allow a

potential maximum of up to 10 months for data collection. We stress that these are the maximum possible limits; in practice, data collection will not take the maximum amount of time.

Description of experiment outline for a single animal

To help clarify what will happen in the experiment, we here describe an example of the procedure for a single animal (the experience for all animals is similar, with differences due to sensory modalities, genotype, and so on). At the start of a recording session, the animal will be placed into the head-fixation on a styrofoam ball inside the dome. By this point, the animal has had considerable experience being handled by the researcher and is familiar with the setup. Furthermore, the animal has learned that the experiment provides liquid rewards. This step is therefore not associated with significant discomfort. Attaching the electrode and fiber from the animal to the equipment takes a few minutes, and then the recordings begin. During the learning task, large and easily discriminable visual objects will appear on the screen (for example, a circle or a triangle). Liquid rewards will accompany one stimulus but not the other stimulus. The reward is available via a dispenser placed close to the mouse's mouth. The mouse simply has to lick to retrieve the reward (we record these licks using sensitive piezos; this provides behavioral evidence of learning). Within a few minutes, the animal learns that one stimulus predicts a reward while the other doesn't. We will test the hypothesis that this learning is accompanied by increases in synchronization between sensory areas and prefrontal/striatal areas. In some conditions, we will use the light fiber to inhibit the activity of molecularly defined interneurons, in order determine their contribution to learning and neural synchronization. Because of the simplicity of the task, the animal will learn the stimulus-reward association within a few minutes; for this reason, different recording sessions will use different stimuli (for example, circles and triangles, or squares and diamonds; complex pictures are also used when they are easily discriminable and matched for low-level visual features). The animal will need to learn new associations each time, which allows us to investigate the learning process over repeated trials.

During the passive "resting tasks" used for stimulation, the animal will remain in the setup but will not perform a task. We will apply brief pulses of electrical stimulation to induce activity, while using the light fiber to inhibit the activity of interneuron populations. This will provide detailed information regarding the contribution of interneuron types to local and inter-regional synchronization. The advantage of these recordings is that we have better control over the patterns of synchronization compared to the endogenous dynamics that appear during learning. The stimulation levels are too low to produce any observable behavioral response, and thus we do not anticipate that the animal will experience discomfort resulting from this stimulation. Animals will receive occasional liquid rewards to maintain their motivation level.

The recording session described above ends (1) after a maximum of 90 minutes, (2) depending on equipment scheduling, or (3) the animal is not motivated to continue. Signs of this latter case include struggling or lack of interest in the liquid rewards. In any of these cases, the animal is immediately removed from the setup and returned to the home cage.

Electrical and optogenetic stimulation

Stimulation is necessary to establish causality. For example, we hypothesize that the mediodorsal thalamus acts as a gate for sensory information to enter the medial prefrontal cortex. We therefore expect that silencing the thalamus will cause a reduction of medial prefrontal theta oscillations. This is a crucial aspect of the research and it is not possible to test these hypotheses using alternative methods.

Electrical microstimulation has been the standard method for transiently perturbing neural networks. Although it is temporally and spatially precise, it lacks any cell-type specificity because it activates all neurons within the current field, and therefore is not very physiologically realistic.

Optogenetic stimulation is equally temporally and spatially precise but also has very high cell-type specificity. It also allows for inhibition, which is not possible with electrical stimulation. But it is also a new technique. We need to compare it to electrical microstimulation in order to determine their differences and to facilitate comparison to the existing literature. Furthermore, combined electrical and optogenetic stimulation gives additional flexibility for investigating 3-way network interactions (e.g., using optogenetics to silence SOM interneurons in the medial prefrontal cortex while providing electrical microstimulation to the thalamus).

Phase 3: Euthanasia and post-experiment anatomical confirmation

To achieve interpretable results, it is important that all animals remain healthy and show no signs of stress or reduced well being during all experimental procedures. Indeed, only healthy animals can provide the best quality data. Animals will be checked daily for any signs of sickness. Humane endpoints of the research are reached by overt signs of sickness, loss of body weight (more than 15%) or other indications of reduced well being.

If discomfort levels appear to be unusually high (immobility, refraining from drinking or eating, pale color of eyes and skin), the animal will be euthanized and a post-mortem examination will be performed with the aim of understanding possible causes and potentially further refining our procedures.

Euthanasia will be performed with an injection of pentobarbital in isoflurane anesthetized animals. After carefully checking the level of anesthesia (absence of tail-pinch reflex), perfusion with paraformaldehyde will be completed in order to remove and section the brain for histological verification of electrodes and fiber placements, and viral expression.

Pilots

It is important to optimize our surgical and experimental techniques. This will improve the scientific quality of the data as well as minimizing discomfort for the animals. We therefore request an additional 35 (WT) animals for piloting (15 for behavioral task piloting, and 20 for surgery piloting). These will be used to test surgical procedures and ensure that the tasks are sufficiently well-designed.

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

STATISTICS FOR NEURAL DATA

For the neural data, we focus on time-frequency-based analyses of oscillations, synchronization, and spike-field coherence. The primary PI involved in this research is an expert in these kinds of data analyses, as exemplified by his 600-page textbook on neuroscience data analyses and statistics (██████████). Each animal will provide many thousands of trials of data, ensuring a large probability of high-statistical-power results. Statistical analyses vary depending on the specific analysis, but mostly involve either (1) non-parametric permutation-based testing or (2) parametric test such as ANOVAs or multiple regressions. Multiple comparisons issues are addressed using: (1) cluster- or maximum-pixel correction for time-frequency-space analyses; (2) Bonferroni correction across groups; (3) split-half replication, in which all analyses are performed on 50% of the data, and the findings are confirmed in the other 50% of the data. Statistics and multiple comparisons corrections will follow standard procedures in neuroscience (Maris and Oostenveld, 2007).

Most of our analyses will focus on changes in neural activity before vs. after brief pulses of stimulation and sensory/reward stimuli. We will compare action potentials, local field potential signals in different frequency bands, EEG activity, and inter-regional synchronization.

CALCULATION OF THE NUMBER OF ANIMALS PER GROUP

Having a sufficient sample size is crucial in neuroscience experiments (Button et al., 2013; Nieuwenhuis et al., 2011). In total, we will utilize 12 animals per group. This number is derived from power analyses of previous literature. For example, the effect sizes from one study using similar analyses (van Wingerden et al., 2014) suggests that 11 animals is sufficient for a power of $\beta=.8$ and $\alpha=.05$. Having 12 animals also provides some buffer in case we need to exclude data if a few animals are not able to complete the tasks, if there are technical problems, or if humane endpoints are reached.

On the other hand, we acknowledge that because of the novelty of our analyses, appropriate sample sizes are not known for all of our analyses. We will closely monitor our results, and if pilot testing reveals that 12 animals per group is more than sufficient, fewer animals may be used.

REFERENCES

Button KS, Ioannidis JP, Mokrysz C, Nosek BA, Flint J, Robinson ES, Munafò MR. (2013). Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience. *Nat Rev Neurosci.* 2013 May;14(5):365-76.

Maris E., Oostenveld, R. (2007). Nonparametric statistical testing of EEG- and MEG-data. *J Neuroscience Methods.* (164) 177-190.

Nieuwenhuis S, Forstmann BU, Wagenmakers EJ. (2011). Erroneous analyses of interactions in neuroscience: a problem of significance. *Nat Neurosci.* 2011 Aug 26;14(9):1105-7.

van Wingerden M, van der Meij R, Kalenscher T, Maris E, Pennartz CM. (2014). Phase-amplitude coupling in rat orbitofrontal cortex discriminates between correct and incorrect decisions during associative learning. *J Neurosci.* 2014 Jan 8;34(2):493-505.

B. The animals

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

We will use six types of mice. Five types are so-called Cre-driver line mice, meaning that they are genetic lines that express Cre-recombinase in molecularly identified neuron subclasses. This allows us to target specific subclasses of neurons. In the previous sections we outlined the justification of animal numbers for each experiment. The sixth group is WT animals that are used for piloting and optimizing surgical and experimental techniques. We will use males and females.

None of the gene lines we will use are associated with physiological impairments or genetic-caused distress or discomfort.

SOMcre, PVBcre, and VIPcre: These animals allow us to target somatostatin-positive, parvalbumin-positive, and vasoactive intestinal peptide-positive cells. As mentioned earlier, these cells are thought to make different contributions to neural computations. We will evaluate the roles of these interneuron types to network oscillations and reward learning.

PyrDeep, PyrSuper: These animals allow us to target excitatory pyramidal cells in the deep vs. superficial layers of the cortex. This is important because the different cortical layers subserve different functional roles in network synchronization and cognition.

| Species | Origin | Maximum number of animals | Life stage |
|--------------------|---------------------|---------------------------|------------|
| Mouse (SOMcre) | Own breeding colony | 72 | Adult |
| Mouse (PBVpre) | Own breeding colony | 72 | Adult |
| Mouse (VIPcre) | Own breeding colony | 72 | Adult |
| Mouse (PYRdeep) | Own breeding colony | 72 | Adult |
| Mouse (PYRsuper) | Own breeding colony | 72 | Adult |
| Mouse (WT, pilots) | Own breeding colony | 35 | Adult |

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.

There are several large-scale efforts to develop accurate computational models of the brain or brain subsystems. Though promising, these models still require confirmation from empirical studies, and are not ready for use in scientific or clinical research. In our own research, we are working on a computational model of medial frontal cortex functioning that will be informed by this research. However, at present, the kinds of experiments discussed in this proposal are necessary to develop a better understanding of brain function. Thus, it is currently not possible to replace animal

models with computer simulations. Furthermore, lower animal species such as insects do not have sufficient cognitive capabilities or brain development to make them valid models for understanding cognitive function in humans. Rodents share several cognitive functions with humans, including sensory decision-making and working memory. Furthermore, the availability of Cre driver lines is a strong argument in favor of using mice, because these lines allow us to investigate the contributions of specific subclasses of neurons to neural and cognitive functions.

The primary measurement techniques used here -- invasive electrophysiology and optical imaging -- are generally not available in humans. There are some clinical situations in which subdural electrodes are placed (e.g., epilepsy or deep-brain-stimulation), but these recordings are generally made from unhealthy tissue, these patients are rare and difficult to access, and the recordings often do not include activity from individual cells. Thus, rodents are necessary and at present cannot be replaced by another species.

Reduction.

Our experiments are designed with the minimal number of animals needed to answer the research questions, while having a sufficient number of animals for high statistical power. As mentioned earlier, there are two important components of our research that work towards reduction of the number of animals that will be tested. First, we obtain high-density multisite chronic recordings from each animal. This sharply reduces the number of animals we need to test to obtain sufficient data. Second, we will make all of our collected data publicly available for other scientists to download and use. This reduces the number of animals tested by other research groups around the world, because several hypotheses can be tested in our data, rather than having to collect new data.

Refinement.

All procedures with the animals will be performed by experienced researchers/caretakers to keep the discomfort for the animals as low as possible. We believe that only healthy animals with minimal stress can provide the high-quality scientific data that we seek. Therefore, we are highly motivated to refine our procedures as best as possible. The procedures and models we use in this proposal are described in literature to give reliable data. Furthermore, we are continuously monitoring and discussing our procedures to minimize discomfort and improve the health and well-being of the animals. A few specific examples are listed below (see also section H3).

- Recent innovations in 3D printing technology now allow us to use lighter and smaller head-mounted electrode holders.
- We have discovered that mice appear more comfortable by making specific adjustments to the head-fixation device (e.g., its angle relative to the floor surface).
- We begin animal handling prior to surgery so that animals are used to human interactions prior to physical discomfort; this reduces stress when being handled after surgery.
- Animals are provided supervised "social play time," in which they can interact with their peers in a cage for 10-30 minutes. Interactions must be supervised by researchers to prevent other animals from damaging the headstages. In addition to reducing overall stress and discomfort, play-time acts as another motivator for animals to perform the tasks and remain calm during testing sessions.

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

Our procedures are guided by strong considerations for the welfare of the animals. Unhealthy or stressed animals provide bad data, and it is thus obvious from both scientific and welfare perspectives that the animals must be kept as healthy and comfortable as possible. Furthermore, we

continuously seek to improve our procedures, and this topic is often discussed in group meetings. Section H3 details sources of discomfort and how we will seek to minimize or mitigate them. A few specific examples of how we strive to minimize discomfort were provided in the previous section.

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.

Non-applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

Single housing is necessary because other mice may bite or scratch at the headpost construction, which could cause infection or other complications. Cages are kept in close proximity to allow animals can see, hear, and smell each other. Animals are checked daily for signs of sickness or stress, and are frequently weighed (typically, daily). Cages include enrichment and nesting materials. Shelters are not included to avoid damaging the headpost.

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.

Following is a list of components of the research that may cause discomfort, and how we will minimize discomfort.

Initial arrival. After arrival or transfer from the breeding facility, animals will be allowed to adapt to the animal facility for at least 7 days. They will be regularly weighed and checked for general health. All animals will be handled to familiarize them to the experimenter and the experimental procedures. Cage enrichment is available.

Surgical implantation of electrodes and viruses. Animals will be weighed and anesthetized with isoflurane (4-5% for induction, reduced during surgery) according to standard protocol. During surgery, animals will be placed on a heating pad and their heart rate and blood oxygenation levels will be monitored continuously. After thorough cleaning of the skin surface, lidocaine (2-4%) will be injected locally around the incision site. Surgery is performed while the animal is under isoflurane-maintained anesthesia.

NaCl will be given subcutaneously to keep the mice hydrated as needed. Carprofen is administered at least 30 minutes prior to the end of surgery, at 5 mg/kg bodyweight. Animals will be kept under observation at 30C, and moved to their cage after approximately after 1 hour where they will have free access to food and water post-surgery. 24 hours after surgery animals are given carprofen. During one week after surgery their behavior, appearance, and weight are monitored closely, once per day (or more frequently if necessary).

Post-surgical procedures. Animals will receive carprofen (s.c.) after surgery as an analgesic. We will also use buprenorphine (in saline s.c.) if the animal is visibly in pain. This will be repeated 24 hours later and again 48 hours later. Saline (at body temperature) will be administered s.c. to prevent dehydration as needed. A heating pad will be placed under the recovery cage to further facilitate post-anesthesia recovery, and will be closely monitored until fully recovered from anesthesia. Once awake, rodents will be placed in their home cage in an independently ventilated cage (IVC) located in a DM-II room for a 2-week quarantine period. After said period, animals may be considered virus free and returned to conventional lab space. Animals will be weighed and checked for general health and recovery from surgery (wound recovery, mobility, etc.) daily for minimum of 3 consecutive days, but typically 5 days, until they regain their pre-operative weight. Animals that do not adequately recover from surgery and show reduced signs of well-being (loss of more than 15% of pre-operative body weight) will be euthanized in accordance with humane end points. Several research groups at the institute have extensive experience with these general stereotaxic techniques and have developed a highly standardized protocol for both the surgical procedures as well as pre-, peri- and post-operative care. Animal welfare logbooks will be kept. Rodents will be allowed to fully recover before commencement of the experiment procedures.

Housing. Single housing is necessary for this research because of the headpost that is attached to the head. Other mice may bite or scratch at this construction, which would cause damage and could lead to infection or death. However, single housing can cause moderate discomfort for mice, because they are social animals. All cages are kept in close proximity, meaning animals can see, hear, and smell each other. Animals are checked daily for signs of sickness or stress, and are frequently weighed (typically, daily). Cages include enrichment and nesting materials. No shelters are included to avoid damaging the headpost.

We will provide "supervised play-time" for the animals. This means putting animals together in the same cage to engage in social interactions, for periods of 10-30 minutes. Researcher/caretaker supervision is necessary to make sure the animals are not damaging each other's implants (this could cause irritation or infection). This play-time reduces stress and, when offered after training/experiment sessions, provides a natural motivator for good behavior during the recordings.

Food and water scheduling. Water or food scheduling is necessary to keep animals motivated to learn and perform the tasks. In general, we prefer water scheduling over food restriction for three reasons: It causes less discomfort, it is easier to regulate, and it has a faster time-course (animals get thirstier faster than they get hungry). Food restriction is used when water scheduling is insufficient. However, excessive restriction is neither necessary nor desirable. Animals will be kept at approximately 90% body weight during training and during early phases of the recordings, estimated through standard growth curves (e.g., through information from Jax). If weight drops below 85%, ad libitum food and water are provided until they return to normal weight. Restriction becomes less necessary as the animals are familiarized and trained on the task.

Behavioral tasks. The tasks are not associated with any direct discomfort (no punishments, shocks, or other aversive stimuli are used). All tasks involve some reward component (typically, liquid reward delivered through spouts). Recording sessions will last no longer than 90 minutes per day, or shorter if there are signs of stress or discomfort, for up to five days per week. Head-fixation causes discomfort, particularly in the beginning. Animals are introduced to head-fixation slowly and are given rewards like sucrose water, soy milk, and sweet yogurt. Within days to a few weeks, animals learn that the head-fixation is safe, is associated with rewards, and does not last very long.

Stimulation. Based on literature and our previous experience, focused brain stimulation techniques do not cause any noxious effects. The stimulation is titrated per animal to be as minimal as possible while producing a measurable effect.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

see H3

Explain why these effects may emerge.

see H3

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

H3

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 include overt signs of sickness or clinical discomfort (for example, dehydration, 15% weight loss in less than 2 days, or a decrease of 20% compared to the weight at start of the experiment). Other risks arise from errors or infections during surgery and implantations. Needless to say, each animal is important and we do our best to avoid unnecessary risks or infections. In our experience, humane endpoints resulting from experimenter or surgical errors in <5% of cases. In such events, discussions are held to determine the source of the incident and strategies to improve our techniques.

Indicate the likely incidence.

Based on previous research and our experience, we anticipate <5%.

K. Classification of severity of procedures

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

We expect that **the animals used for the research** will experience severe discomfort resulting from the surgery and recover from anesthesia, and from single-housing (animals are in continuous smell/sound range of each other, which mitigates this source of discomfort to some extent). **We expect that up to 35 animals used for piloting will experience mild discomfort, resulting from handling and water/food restriction for animals used in behavioral piloting, or anesthesia induction for the animals used in the surgical pilots.** Even in the exceptional situation of an infection from surgery (we anticipate this to be <5% of cases), pain management drugs and timely application of the humane endpoints will prevent extreme discomfort.

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.

It is necessary to confirm the expression of the virus and placement of the electrodes in post-mortem imaging of the brain.

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2016-0079
2. Titel van het project: Interneurons, oscillations, and learning
3. Titel van de NTS: Neuronen, oscillaties en leerprocessen
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 23-11-2016
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 06-12-2016 en 10-01-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 12-12-2016 tot 20-12-2016 en van 17-01-2017 tot 06-02-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 20-12-2016 en 06-02-2017
 - advies aan CCD: 17-02-2017
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager:
 - Datum: 10-01-2017
 - Plaats: Nijmegen
 - Aantal aanwezige DEC-leden: 8
 - Aanwezige (namens) aanvrager: [REDACTED]
 - Gestelde vragen: De commissie heeft de onderzoekers verzocht de achtergrond en de doelen van deze aanvraag mondeling toe te lichten, omdat zij de indruk heeft dat het de afhandeling van deze complexe aanvraag zou kunnen vereenvoudigen. De commissieleden stellen enkele vragen ter verduidelijking.
 - Verstreckte antwoorden: [REDACTED] geeft de gevraagde toelichting en beantwoordt de vragen.
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot nieuwe vragen en opmerkingen voor de aanvrager. Deze zijn hieronder weergegeven (d.d. 17-01-2017).
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum vragen: 12-12-2016
 - Datum antwoorden: 20-12-2016
 - Gestelde vragen en antwoorden:
Project Proposal:

-3.1: Een belangrijk doel van deze projectaanvraag is te onderzoeken hoe het executieve neurale circuit is betrokken bij leerprocessen. Deze leerprocessen zijn nog onvoldoende ingeleid in de context van dit onderzoek.

Antwoord: Apologies that this was not clearly enough described. During stimulus-reward learning, neural synchronization is increased between the medial prefrontal cortex, striatum, and sensory processing regions. Our research will elucidate the roles of different neuron subclasses in changes in neural synchronization that occur during learning. Additional text has been added in sections 3.1 and 3.2.

-3.1 Klopt de bewering dat pyramidale cellen de meerderheid van de hersencellen vormen?

Antwoord: Yes, pyramidal cells comprise approximately 75% of the cells in the brain. Although interneurons are in the minority, they are extremely important for regulating the activation and timing of pyramidal cells. However, very little is known about the precise contributions of interneuron subtypes in neural synchronization and inter-regional information transfer, which is one of the reasons why the proposed research is important. This is now mentioned in section 3.1.

-3.2: De vraagstelling is onvoldoende scherp gesteld. Wat verwachten de onderzoekers te zien, in welke gebieden willen ze precies de elektrodes implanteren, wanneer is het doel bereikt? Gaan de onderzoekers het verloop van het leerproces in beeld brengen? Kunnen de onderzoekers de drie doelstellingen nog wat extra uitwerken en hun hoofddoelstelling ook hier vermelden?

Antwoord: This is now more concretely described. Perhaps part of the confusion here is that several of these questions are discussed in other parts of the proposal; I was not aware that section 3.2 should be so detailed.

I also decided to merge the first two goals because they were very similar to each other (the first was focused on local activity while the second was focused on long-range interactions, but these are similar enough to combine into one goal).

-3.4.1: Voor een muis is 16 maanden in experiment erg lang. Bovendien is de commissie van mening dat de combinatie van alle handelingen gedurende een dergelijke lange periode tot ernstig ongerief voor de dieren leidt. Waarom willen onderzoekers 5 dagen per week 16 maanden lang aan één muis meten? Is er geen moment te definiëren waarop voldoende metingen aan één muis zijn verricht?

Antwoord: Indeed, 16 months can be a long time for a mouse. We were concerned about needlessly stopping the experiment too soon, e.g., if the animal appears healthy and if there are delays for other reasons (e.g., technical difficulties or construction in the building that is out of our hands). But we understand the concern. The maximal duration is now changed to 10 months. We believe that acquiring a lot of data from individual animals helps reduce the total number of animals that need to be recorded. We would also like to point out that the animals quickly get used to the implant, that it does not interfere with their normal behavior (eating, sleeping, nesting, etc.) and that the experiment is associated with rewards.

The measurements of 90 minutes per day, 5 days per week is also a maximum. In practice there are typically fewer measurements due to scheduling, equipment availability, possible delays due to technical difficulties or building renovations, or when the animal is unmotivated. This maximum will be reached only if the equipment is available and if the animal is sufficiently motivated and healthy. This is now detailed in section 3.4.2.

Verwachten de onderzoekers dat een zo lange periode haalbaar is in de praktijk? Bovendien gaan de onderzoekers voorbij aan het feit dat de muizen in het beschreven tijdsbestek

verouderen en dus veranderen. Is het niet verstandiger deze langlopende experimenten te vervangen door korter durende experimenten met meer dieren?

Antwoord: Yes, mice age within this time-frame. We initially made our calculation based on avoiding a situation in which the experiment is delayed and the animal is healthy, and considering the balance between collecting more data in fewer animals vs. collecting less data in more animals. As written above, the maximum duration is now reduced to 10 months.

Description of Animal Procedures:

-K: De beschreven handelingen veroorzaken tezamen ernstig ongerief voor de dieren. Graag een maximum aantal maanden (zie vragen boven) aangeven voor de looptijd van het experiment.

Antwoord: The maximum number of months has been reduced to 10 months. Animals are regularly inspected for health and well-being, and the experiment will end if humane endpoints are reached. The DAP has been updated according to the modifications described above for the background sections.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

- Datum vragen: 17-01-2017
- Datum antwoorden: 06-02-2017

-Deze basaal wetenschappelijke projectaanvraag richt zich op het vergaren van kennis over het optreden van oscillaties in het executieve netwerk en de bijdrage van verschillende typen interneuronen daaraan. Deze kennis is van belang om verstoringen in het executief functioneren te kunnen begrijpen en nieuwe behandelingen te ontwikkelen. Instrumenteel leren is een voorbeeld van executief functioneren. Tijdens de presentatie heeft de onderzoeker uitgelegd waarom hij juist dit voorbeeld heeft gekozen, maar die informatie ontbreekt nog in de aanvraag. Zijn de onderzoekers vooral geïnteresseerd in de oscillaties, of gaat het hen daadwerkelijk om de veranderingen hierin tijdens het leerproces? Wordt het ongestoorde leerproces ook bestudeerd? De commissie verzoekt de onderzoekers een reëel beeld te presenteren van het doel van het onderzoek: gaat het alleen over oscillaties, of is het leerproces de hoofdcomponent? (onderdeel 3.1).

Antwoord: These two aspects (learning or oscillations) are not mutually incompatible. Neural oscillations are thought to be a core mechanism by which information is processed in the brain, and information processing is fundamental to learning. On the other hand, it is important to link our fundamental findings to cognitive processes, hence the need for a behavioral task. There are many tasks we could have used that would allow us to study neural oscillations. We selected learning because it allows us to link our findings to findings in humans and to modern neuroscientific theories concerning the roles of oscillations in sensory-reward learning. The roles of different interneuron types on neural oscillations and synchronization is important for understanding healthy and abnormal human brain function, and for understanding how medications (including anti-psychotics and Parkinson's medications) alter brain activity, but it is impossible to do this kind of research in humans. Therefore, we believe this is important research that justifies the use of non-human animals.

-In aansluiting op het eerste punt wil de commissie het volgende opmerken. De onderzoekers schrijven dat zij de relatie tussen oscillaties en instrumenteel leren willen onderzoeken. In de aanvraag wordt goed uitgelegd hoe de onderzoekers de rol van interneuronen bij het optreden van oscillaties in het executief netwerk zullen onderzoeken.

De commissie mist echter een beschrijving van de stapsgewijze aanpak (strategie) waarmee de veranderingen in oscillaties tijdens het proces van instrumenteel leren worden onderzocht. Zo blijft onderbelicht welke leertaak wordt gebruikt, welke hypothesen zullen worden onderzocht en welke strategie daarvoor wordt gebruikt. Op welke manier zal de onderzoeker het leerproces en de daarbij optredende oscillaties onderzoeken? Welke stappen zijn hiervoor nodig? Een beschrijving van de experimentele handelingen is geen afdoende beschrijving van de wetenschappelijke strategie. (onderdeel 3.4)

Antwoord: Apologies that this was not clearly enough described. There is now more detail about the procedures for testing learning.

-Tijdens de presentatie heeft de onderzoeker met een berekening toegelicht waarom hij één muis gedurende zeven maanden meerdere keren wil testen. De looptijd van het experiment (nu 10 maanden) is hierop gebaseerd. Deze berekening is essentieel om de looptijd van het experiment te begrijpen, maar ontbreekt nog in de projectaanvraag. (DAP, onderdeel A)

Antwoord: The protocol is now clarified to indicate that we anticipate approximately 40 hours of recordings spread out over small recording sessions.

-De onderzoekers willen op basis van eerdere resultaten 12 dieren per groep inzetten. Uit het gevraagde aantal dieren leidt de commissie af dat de onderzoekers 6 groepen zullen testen. Een beschrijving van hetgeen in deze 6 groepen dieren getest zal worden ontbreekt nog. (DAP, onderdeel B)

Antwoord: The sixth group is wildtype animals used for piloting. I apologize that this was not clearly stated in DAP-B. The text is now adjusted. Or was the confusion about 72 animals per group divided by 12 animals per task = 6 tasks? This is because for each Cre line there are six different experiments corresponding to three sensory modalities and two brain imaging methods (3x2x12 = 72 per group). This is described in DAP-A2.

-De commissie is van mening dat het cumulatief ongerief voor de dieren door de combinatie van alle handelingen (inclusief hersenmanipulaties aan een dier bij bewustzijn) en de lange looptijd van het experiment (en daarmee van de individuele huisvesting) kan oplopen tot ernstig ongerief. (DAP, onderdeel K)

Antwoord: "Moderate" has been changed to "severe" in section DAP-K.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Invulling definitie project' van de CCD. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. Het betreft explorerend basaal

wetenschappelijk onderzoek naar executief functioneren bij muizen. Er zijn twee primaire doelen in het project beschreven, die elk bijdragen aan de hoofddoelstelling. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.

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

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is te achterhalen hoe de verschillende typen cellen uit het executieve netwerk bijdragen aan instrumenteel leren. Het uiteindelijke doel is bijdragen aan nieuwe behandelmogelijkheden voor mensen waarbij het executief functioneren door ziekte of een aandoening is aangetast. De aanvragers noemen schizofrenie en ernstige depressie als voorbeelden van ziekten waarbij het executief functioneren minder goed verloopt. De resultaten van dit onderzoek zijn bovendien relevant voor wetenschappers die cognitie bestuderen of hersenonderzoek doen met dieren of computermodellen. Het betreft zeer basaal wetenschappelijk onderzoek, dat nog op grote afstand van een eventuele toepassing staat. De DEC is daarom van mening dat er binnen dit project geen reële relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel. De commissie vindt dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld, omdat het kennis zal opleveren die veel wetenschappers kunnen gebruiken in hun fundamentele of translationele onderzoek.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.
Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).
Dit onderzoek is in de eerste plaats wetenschappelijk van belang, omdat het naar verwachting bijdraagt aan een vermeerdering van de kennis in dit onderzoeksveld. Het betreft fundamenteel strategisch onderzoek gericht op het verwerven van fundamentele inzichten en kennis. Dergelijk onderzoek is onmisbaar voor de voortgang van zowel fundamenteel als translationeel onderzoek. Voor patiënten is dit onderzoek dus ook slechts indirect en op de lange termijn van belang. Uiteindelijk zouden de verworven inzichten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe interventies voor met name neurologische aandoeningen. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor ernstige hersenziekten, zoals schizofrenie en ernstige depressie, is van groot belang voor de samenleving.
6. De onderzoekers maken gebruik van genetisch gemodificeerde virale vectoren en transgene

dieren waarbij zij de nationale GGO-regels in acht nemen. Hierdoor is er geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De commissie heeft de aanvrager verzocht meer inzicht te geven in de hypothesen die getest zullen worden en te beschrijven welke stappen hiervoor nodig zijn. Het antwoord van de aanvrager wordt vooral gegeven op het niveau van de proefopzet. Dit type onderzoek is vooral explorerend van aard, en er worden zeer veel data verzameld tijdens de metingen in de proefopzet. Met deze data kunnen meerdere hypothesen door verschillende onderzoekers van meerdere onderzoeksgroepen/instituten worden onderzocht. Deze onderzoekers zijn geïnteresseerd in neurale oscillaties en het optreden daarvan tijdens een eenvoudige leertaak. Uit de beschrijving van de proefopzet blijkt dat een muis telkens een nieuwe (instrumentele) leertaak krijgt die enkele minuten duurt. Dit is een goede opzet om dergelijke leertaken te onderzoeken. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
 - Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de stereotactische operatie, de hersenmanipulaties aan een dier bij bewustzijn, en de lange looptijd waardoor langdurige solitaire huisvesting nodig is. De commissie is van mening dat het cumulatief ongerief voor de dieren hierdoor kan oplopen tot maximaal ernstig ongerief.
12. De integriteit van het dier wordt aangetast door het aanbrengen van een 'headpost' waardoor de kop gefixeerd kan worden tijdens de metingen. Het dier wordt hierdoor buiten de meetopstelling

in lichte mate gehinderd in zijn normale gedrag. Het aanbrengen van de 'headpost' verandert ook het uiterlijk van het dier. Het vormt een zichtbaar bewijs van het feit dat het dier "instrumenteel" gebruikt wordt. Tijdens de metingen zal het dier verder de indruk krijgen dat hij zich in een vreemde wereld bevindt waarin hij zich kan verplaatsen in de richting van niet-natuurlijke objecten. Dit staat op het eerste gezicht erg ver af van de natuurlijke omgeving van het dier. Echter, het dier is hiertoe in staat door van nature aanwezige nieuwsgierigheid en leervermogen. Er zijn geen aanwijzingen dat dit het gedrag en de psyche van het dier negatief beïnvloedt.

13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van eerdere ervaringen met deze experimenten ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De onderzoekers willen interacties tussen bepaalde hersengebieden en/of neuronen onderzoeken, en het effect van stimulatie van bepaalde neuronen of hersengebieden op het leergedrag analyseren. Dit kan niet bij mensen en kan ook nog niet goed zonder proefdieren onderzocht worden. De resultaten zullen wel bijdragen aan het maken van computermodellen die op termijn gebruikt kunnen worden om bepaalde onderzoeksvragen te kunnen beantwoorden.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. De onderzoekers gebruiken nieuwe analyses, waardoor zij moeilijk kunnen voorspellen hoeveel dieren per groep nodig zijn om significante resultaten aan te kunnen tonen. Zij gaan daarom uit van 12 dieren per groep. Wanneer uit tussentijdse analyses blijkt dat minder dieren per groep nodig zijn, dan zullen zij dit aanpassen in hun proefopzet. De onderzoekers zullen veel data op meerdere tijdstippen of in meerdere situaties verzamelen van elk dier, zodat hiermee verschillende onderzoeksvragen beantwoord kunnen worden door de onderzoekers zelf of door collega's die toegang krijgen tot de data. Hierdoor wordt de wetenschappelijke opbrengst van de experimenten geoptimaliseerd en zijn mogelijk voor het beantwoorden van toekomstige onderzoeksvragen geen, of minder, dieren nodig.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De experimenten kunnen niet met minder complexe dieren worden gedaan omdat de hersenfunctie en het gedrag van deze dieren te weinig overeenkomen met de humane situatie. De onderzoekers plaatsen en ontwerpen de 'headpost' en de elektrodehouder zodanig dat de dieren er zo min mogelijk last van hebben. Om de stress van solitaire huisvesting te verminderen zullen de dieren regelmatig onder supervisie met nestgenoten kunnen interacteren. Na vragen van de commissie is de maximale looptijd van de experimenten per dier gereduceerd van 16 maanden naar 10 maanden. De onderzoekers hebben berekend dat zij in totaal ongeveer 40 uur dienen te meten aan één dier (verdeeld over meerdere meetsessies) om wetenschappelijk betrouwbare data te verkrijgen. Verdere beperking van de maximale looptijd zou de kwaliteit van de data in gevaar kunnen brengen. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de

meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate ingezet worden.
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om de hersenen te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een matige tot maximaal ernstige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen er alles aan om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.
Voor patiënten is dit onderzoek indirect en pas op de lange termijn van belang. Uiteindelijk zouden de verworven inzichten kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe interventies voor met name neurologische aandoeningen waarbij het executief functioneren is aangetast, zoals schizofrenie en ernstige depressie. De huidige behandelingen hebben bij het merendeel van de patiënten te weinig resultaat. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor ernstige hersenziekten is van groot belang voor de samenleving. Dit onderzoek is echter in de eerste plaats van belang, omdat het naar verwachting bijdraagt aan een vermeerdering van de kennis in dit onderzoeksveld. Het betreft fundamenteel strategisch onderzoek gericht op het verwerven van fundamentele inzichten en kennis. De inzichten uit dergelijk onderzoek zijn onmisbaar voor de voortgang van zowel fundamenteel als translationeel onderzoek. De commissie acht meer kennis over executief functioneren en de bijdrage die die kennis uiteindelijk zou kunnen leveren aan het ontwikkelen van nieuwe behandelstrategieën voor verschillende aandoeningen van de hersenen, van substantieel belang.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: achterhalen hoe de verschillende typen cellen uit het executieve netwerk bijdragen aan instrumenteel leren. De DEC is van mening dat het belang van het verwerven van nieuwe kennis over het executief functioneren en de bijdrage die dat kan leveren aan de voortgang in dit onderzoeksveld en andere onderzoeksvelden (doordat de beschikbaar gestelde data ook bruikbaar zijn voor andere onderzoekers) voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van

de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

X Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

- Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

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

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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



12.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**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

AVD103002017873

Bijlagen

1

13 MRT 2017

Datum 10 maart 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 17 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Interneurons, oscillations, and learning" met aanvraagnummer AVD103002017873. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 8 maart 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Er is u gevraagd formuleringen in de Niet Technische Samenvatting te herzien en in de bijlage dierproeven de afwijkende huisvesting en ongeriefclassificatie te verduidelijken. U heeft de vragen beantwoord en de Niet Technische Samenvatting en de bijlage dierproeven 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 "Interneurons, oscillations, and learning" starten. De vergunning wordt afgegeven van 17 maart 2017 tot en met 16 maart 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat de looptijd van een project niet langer kan zijn dan 5 jaar.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Beoordeling achteraf

Na afloop van het project zal er een beoordeling plaatsvinden, zoals bedoeld in artikel 10a1, lid 1d en lid 3, in de wet. Meer informatie over de eisen bij een beoordeling achteraf vindt u in de bijlage.

De beoordeling achteraf is vereist vanwege de ongeriefclassificatie ernstig.

Datum:
10 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017873

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC 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:

Datum:
10 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD103002017873

ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres: Postbus 9101

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 17 maart 2017 tot en met 16 maart 2022, voor het project "Interneurons, oscillations, and learning" met aanvraagnummer AVD103002017873, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 17 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 februari 2017, ontvangen op 17 februari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 8 maart 2017

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|-----------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------------------------|-------------|
| 3.4.4.1 Description of procedures for surgery and tasks. | | | | |
| | Muizen (<i>Mus musculus</i>) / 6 verschillende stammen zoals beschreven in bijlage 3.4.4.1 | 395 | 95% Ernstig 5% Matig | |

Voorwaarden

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

In dit project worden dierproeven toegepast die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk maart 2023 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

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

Aanvraagnummer:
AVD103002017873

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:
AVD103002017873

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:

AVD103002017873

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.

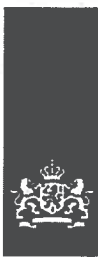
Uit artikel 13d volgt dat het doden van dieren door een deskundig persoon moet worden gedaan, wat zo min mogelijk pijn, lijden en angst met zich meebrengt. De methode om te doden is vastgesteld in de Europese richtlijn artikel 6.

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.

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.

| Inventaris Wob-verzoek W17-08 | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------------------|----------------|-----------------|--------|-------|--------|-------------------|--------|------|--|
| | | | wordt verstrekt | | | | weigeringsgronden | | | |
| nr. | document NTS 2017876 | 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 1 | | | x | | | | | | |
| 5 | Bijlage 2 | | | x | | | | | | |
| 6 | Bijlage 3 | | | x | | | | | | |
| 7 | DEC advies | | | | x | | x | x | | |
| 8 | Ontvangstbevestiging | | | | x | | x | x | | |
| 9 | Advies CCD | | x | | | | | | x | |
| 10 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | | |



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 30100 | |
| | | <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen | |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt. | Naam instelling of organisatie | Stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis |
| | | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [REDACTED] |
| | | KvK-nummer | 40530817 |
| | | Straat en huisnummer | Plesmanlaan 121 |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | Postbus | 90203 |
| | | Postcode en plaats | 1066 CX Amsterdam |
| | | IBAN | NL71DEUT0626343534 |
| | | Tenaamstelling van het rekeningnummer | Stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker. | (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| | | Functie | [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 | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | [REDACTED] | |
| Afdeling | [REDACTED] | |
| Telefoonnummer | [REDACTED] | |
| E-mailadres | [REDACTED] | |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 3 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 3 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Screening for drivers of gastric cancer
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Screening voor drijvers van menselijke kanker
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-----------------------------------------------------|
| Naam DEC | NKI |
| Postadres | t.a.v. [REDACTED]; Postbus 90203; 1006 BE Amsterdam |
| E-mailadres | [REDACTED] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.541,- 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 | Amsterdam |
| Datum | 20 - 2 - 2017 |
| Handtekening | [REDACTED] |



Form Project proposal

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

1 General information

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

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Cancer is a major cause of death worldwide. In the Netherlands alone, 130,836 new cases were diagnosed and 43,214 deaths resulted from cancer in 2014 (<http://www.cijfersoverkanker.nl/>). This translates to a significant burden on patients and their families in terms of suffering and also on society

in a socio-economic context. Therefore, there is a great need for more effective cancer screening and treatments.

Gastric cancer is the 4th most common cancer and the 2nd leading cause of cancer death worldwide [Jemal et. al., 2011]. The 5-year survival rate is <25%, which is due partly to the fact that it is difficult to detect dangerous lesions at an early stage [Marano et. al., 2016]. Additionally, screening for gastric cancer is not routinely performed and, unless a patient has a previously known risk factor, he is not likely to undergo endoscopy or radiography to detect stomach cancer. Finally, there are multiple histological and molecular subtypes, which likely respond to treatment differently.

Approximately 80% of gastric cancer patients inheriting a mutant version of the CDH1 gene, which encodes a protein called E-cadherin, will develop a specific type of gastric cancer called Hereditary Diffuse Gastric Cancer (HDGC). This is an inherited cancer syndrome that leads to an increased risk for both diffuse gastric cancer and lobular breast cancer [Tan et. al., 2015]. Patients who inherit a mutant copy of CDH1 are at high risk for developing gastric cancer at a young age, with an average age at diagnosis of 38 years [Fitzgerald et. al., 2010; Guilford et. al., 1998]. Additionally, female carriers are at an increased risk (50% lifetime risk) for lobular breast cancer [Dossus et. al., 2015]. Currently the only effective treatment is to perform a debilitating surgery to remove the stomach. However, proper timing of the operation is difficult given the absence of a thorough understanding of the multiple steps in gastric cancer carcinogenesis. This prohibits the development of predictive tests, resulting in many patients being either over or under treated.

E-cadherin plays a central role in cell adhesion, allowing cells to stick to one another, and HDGC families are at an increased risk of developing diffuse-type, signet ring cell gastric adenocarcinoma [Guilford et. al., 2010]. Signet ring cells exist as isolated cells, or in small clusters, in the lining of the stomach. Accordingly, diffuse gastric cancer is difficult to diagnose even with routine screening because the cancer often cannot be seen during upper endoscopy. Therefore, most cases of diffuse gastric cancer are diagnosed at late stages (III or IV), when the cancer is incurable.

Although CDH1 mutations confer a high risk of gastric cancer, several studies using mouse models suggest that a CDH1 mutation alone is not sufficient for the development of gastric cancer. In one study, which used a parietal cell-specific E-cadherin knockout mouse, clusters of signet ring-like cells were found, but no invasive gastric adenocarcinomas were observed, supporting the idea that other factors are needed for the development of gastric cancer in a CDH1-mutated background [Mimata et al., 2011]. Furthermore, in a second study, CDH1^{+/-} mice did not develop gastric cancer unless they were treated with the stomach carcinogen, N-methyl-N-nitrosourea [Humar et. al., 2009]. In this study, the authors successfully induced signet-ring cell carcinomas in CDH1^{+/-} mice. However, they did not perform experiments to determine what additional mutations were needed in order to drive tumorigenesis [Humar et al., 2009]. Most recently, the first genetically engineered mouse model of diffuse gastric cancer was created using conditional knockout of both CDH1 and TP53 [Shimada et al., 2012]. Beginning around 6 months of age, these mice developed both intramucosal and invasive cancers, containing poorly differentiated carcinoma and signet-ring cells. By 12 months, all mice had reached humane endpoints due to metastatic gastric cancer. Mice heterozygous for CDH1 and null for TP53, and vice versa, did not develop gastric cancer in this time frame, indicating that deletion of both CDH1 and TP53 is necessary to drive gastric cancer in this setting [Shimada et. al., 2012]. Therefore, it appears that only a single additional mutation, in this particular case in the TP53 gene, is enough to initiate the progression from normal stomach epithelium to stomach cancer in a CDH1 mutated background [Shimada et al., 2012].

Additionally, studies involving the APC gene further support the argument that a single mutation, in addition to CDH1, is enough to drive diffuse gastric cancer within 6-9 months. In a constitutive knockout model, mice heterozygous for both APC and CDH1 develop stomach cancer at 100% penetrance, while mice heterozygous for CDH1 do not develop stomach cancer [Smits et. al. 2000]. Additionally, mice heterozygous for APC developed a single tumor in 4 out of 11 stomachs examined, while mice heterozygous for both APC and CDH1 had at least 1 tumor (range 1-5) in all 14 stomachs examined [Smits et. al., 2000].

The long latency observed in both of the studies mentioned, regardless of mechanism, is ideal for our

purposes, as this gives the patient more time between occurrence of a driver mutation and development of gastric cancer. This allows time for screening (which may be only once per year), analysis of the biopsy, and scheduling surgery.

Since only a single mutation in addition to CDH1 is needed to initiate gastric cancer, it is possible to use an unbiased screening approach to identify additional drivers in a CDH1-mutant background. This notion is supported by a recent publication in non-small cell lung cancer [NSCLC; Chen et al., 2015]. In this paper, the authors use a CRISPR/Cas9 genome-wide knockout library to screen, *in vivo*, for genes which drive metastasis in non-small cell lung cancer. Starting with a parental NSCLC cell line, containing a mutated TP53 gene and heterozygously mutated KRAS and DICER genes, the authors made a clonal sub-line expressing Cas9-EGFP. Then, they transduced the mouse GeCKOa lentiviral guide RNA library into these cells at a multiplicity of infection (MOI) of 0.4 to generate a pool of mutant cells. After selection, 3×10^7 cells were injected into the right flank of four immunocompromised mice. One mouse was analyzed after 2 weeks to represent an early tumor time point, and three mice were analyzed at 6 weeks to represent a late tumor and, hopefully, metastasis time point. Interestingly, when the mice were analyzed by CT scan, lung metastases were identified in mice injected with the transduced cell pool. When the number of unique gRNAs in the plasmid library, in the transduced cell pools, early and late primary tumors, and lung metastases were quantified, the number of unique gRNAs drops off throughout the evolution of the tumors, indicating enrichment for certain gRNAs over others. Furthermore, in each lobe of the lung, the reads were dominated by one or two gRNAs. This suggests that the metastases were seeded by a small subset of cells from the primary subcutaneous tumor. Hits which accelerate metastasis comprised both well-known tumor suppressors (Nf2, Pten and Cdkn2a) and less well-characterized genes (Trim72, Fga, mir-152 and mir-345). Importantly, the authors investigated whether mutations affecting these genes are found in patients using cBioPortal. Indeed, 75% of the genes targeted by gRNAs enriched in the lung metastases are downregulated in metastatic tumors in NSCLC patients.

Therefore, we are confident that performing a screen, similar to that described above, for genes that drive tumorigenesis will provide important information to achieve our goals. Analogous to the approach used in NSCLC, we will use a CRISPR/Cas9 mediated *in vivo* approach to identify the genes responsible for progression from normal gastric tissue to gastric cancer.

Once candidate genes are identified, we would like to validate them in an independent study. *In vitro* and *in vivo* cancer models have been instrumental in the understanding of the genetics of cancer in order to develop new therapies. The observation that cell lines grow in 2D and can only be established with low efficiency suggests that they do not represent the full spectrum of cancer phenotypes. In an attempt to provide a more physiological model system of primary tumor and normal cells, the organoid platform has been established. Organoids are three-dimensional cell cultures, grown with extracellular matrix-like support and under conditions that mimic the stem cell niche of the relevant tissue. This has resulted in the possibility to culture primary cells of the stomach, gut, liver, pancreas, prostate, and lung with unprecedented success [Boj et. al., 2015; Gao et. al., 2014; Karthaus et. al., 2014; Sachs N. unpublished data]. For example, organoids were established with a 90% success rate from treatment-naive surgical resections of primary colorectal cancers [van de Wetering et. al., 2015] and as high as 71% from needle biopsies of metastases [Weeber et. al., 2015]. Importantly, organoids maintain the mutational make-up of the original tumor tissue [Weeber et. al., 2015]. This provides a unique opportunity to study cancer in a personalized manner. Moreover, healthy and tumor-derived organoid cultures can be genetically manipulated allowing for functional analysis of individual mutations in both tumor and normal cells. Therefore, tumor organoids have the potential to revolutionize cancer medicine by providing an *ex vivo* test platform for the individual patient. We aim to utilize organoids, combined with mouse models of gastric cancer, to validate hits from our *in vivo* screen for drivers of CDH1-mutated gastric cancer to improve screening in HDGC families.

In this way, we aim to dissect the genetics of gastric tumorigenesis in order to develop a test that will improve surveillance in HDGC families and allow timely surgery. For a visual overview of the flow of our project application, please see the attached flowchart.

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?

Research objective:

Our overarching goal is to use organoids, in combination with mouse models of gastric cancer, to validate hits from our in vivo screen for drivers of CDH1-mutated gastric cancer to improve screening in HDGC families.

The key factor in this goal is to identify genes that drive the progression from normal gastric epithelial tissue to cancer. As such, we aim to:

1. Identify candidate genes involved in HDGC.
2. Validate those candidate genes.
3. Explore the role of validated candidate genes in malignancy.

Achievability:

We believe that this objective is achievable for several reasons:

1. Previous studies indicate that only one mutation in addition to CDH1, for example either TP53 or APC, is sufficient to drive gastric tumorigenesis [Shimada et al., 2012; Humar et al., 2009; Smits et. al., 2000]. This provides confidence that our screen, starting with a CDH1 mutated genetic background, will result in additional hits that drive gastric cancer.
2. A similar CRISPR in vivo screening approach has been used in NSCLC to successfully identify genes involved in metastasis [Chen et al., 2015].
3. Two independent groups have successfully used targeted mutations made by the CRISPR/Cas9 method in colorectal organoids to identify the genes which drive tumorigenesis in this tissue [Matano et. al., 2015; Drost et. al., 2015].
4. All of the technologies that we will use in this project are established and published. Additionally, we have existing collaborations with several of the labs which have developed these technologies to help ensure the success of this project in our hands.

3.3 Relevance

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

Scientific relevance:

We hope that our contributions will be two-fold. First, we aim to shed light on the genetic mutations that are required, in combination with a CDH1 mutation, to drive the progression from normal stomach tissue to gastric cancer. Although we focus on CDH1 mutated gastric cancer in this proposal, it is also possible that any driver mutations we identify may be important in CDH1 wildtype gastric cancer as well. As we plan to do these experiments in both human and mouse organoids, we will also explore the similarities and differences in the genes responsible for progression of human and mouse gastric cancer. Second, we expect these insights will lead to changes in patient screening, which will allow us to develop a genetic test to identify potentially harmful cells at an earlier time point.

Social relevance:

Individuals who are known to carry a CDH1 mutation are at high risk of developing one of the most difficult to treat cancers: gastric cancer. To live life in constant fear of developing cancer at a young age is a huge burden, not only for the affected individual, but also for their families. The only potential cure is to surgically remove the stomach at an early age. This has significant impact on patient quality of life. Developing a test that can predict whether there is, indeed, the need for surgery may reduce this burden for the families and give them a better perspective. In this project, we aim to improve screening for gastric cancer in families at risk for developing hereditary diffuse gastric cancer, in order to decrease cancer-associated death and to improve patient quality of life.

3.4 Research strategy

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

To identify the genes that will be included in our screen, we have used cBioPortal and filtered for all gastric cancers containing a CDH1 mutation. Within this subset of patients, we looked for all genes that

are mutated at any percentage, which resulted in a list of 865 genes. We then extracted gRNAs for these genes from existing, validated whole genome mouse CRISPR libraries. These gRNAs, as well as 200 non-targeting gRNAs, will be cloned into a lentiviral gRNA expression vector and the cloned library will be sequenced to ensure that complexity is maintained. This lentiviral gRNA library will then be used to perform our in vivo screen in mice.

As the immune system and tumorigenesis are intimately linked, we have elected to perform this screen using immune competent mice containing CDH1 and Cas9 conditional alleles. Importantly, these mice are known to be immune tolerant to Cas9 expression [Annunziato et al., 2016]. To perform the screen, we will delete CDH1 and activate Cas9 specifically in the stomach using a lentivirally delivered Cre. We have chosen this approach because the cells from which diffuse gastric cancer originates have not yet been identified. By choosing this method of Cre delivery, we are able to delete CDH1 and activate Cas9 in all cell types in the stomach epithelium.

The lentiviral gRNA library itself will be cloned into the same plasmid and, therefore, delivered in the same manner and at the same time as the lentiviral Cre. We will do this using a commercially available kit designed for in vivo use and which has been shown to work successfully for lentiviral transduction of the stomach epithelium, and which also indicates that lentiviral transduction in the acid environment of the stomach is possible [Ozbiosciences; Scherer et. al., 2002]. Briefly, the lentiviral particles are mixed with magnetic particles and injected into the stomach. A magnet is placed under the stomach for 20 minutes to allow transduction of the stomach epithelium to occur. Using previous studies as a guide, the mice will be sacrificed at four time points, the stomachs removed and submitted for pathological examination [Shimada et. al., 2012; Humar et. al., 2009].

After we have identified a candidate list of genes from our in vivo screen, we will select 10-15 of our top candidates for validation using an orthotopic mouse model. We will do this based on the significance of enrichment of each gRNA, the frequency which these mutations are found in CDH1 mutated gastric cancer patients, and the function of each candidate. Then, we will use the CRISPR/Cas9 system to engineer CDH1-mutated, but non-cancerous, gastric organoid lines to contain mutations in our candidate genes. We will do this to test the ability of each line to form tumors in an orthotopic mouse model of gastric cancer. To confirm that the hits we identify in mice translate to the patient setting, we will validate our hits with both mouse and human CDH1 mutant gastric organoids.

We would additionally like to identify combinations of mutations which are likely to result in more aggressive gastric carcinomas. We will do this by creating an allelic series ranging from single, to all possible combinations of double, and triple mutations in genes commonly co-mutated with CDH1 and which are identified as hits in our screen. We will also perform this experiment with three genes previously identified as drivers of gastric cancer by the TCGA and which also co-occur with CDH1 mutations [Wang et. al., 2014; cBioPortal].

The engineered organoids will then be orthotopically implanted and allowed to grow for up to 12 months. Although several orthotopic models of gastric cancer are available, we have elected to use the published, non-surgical, electrocoagulation-based orthotopic mouse model of gastric cancer, as this model most closely mimics the development of gastric cancer in the human setting and will cause the least discomfort out of the available orthotopic methods [Bhullar et al., 2010]. The technology for this method is in place in collaboration with the group in the United States that developed the method. At multiple time points within the 12 month time frame, mice will be sacrificed and submitted to the NKI Animal Pathology Department for pathological evaluation of gastric tumor growth. This will provide us information on the critical limit regarding the number of mutations needed in order for normal gastric tissue to transition to gastric cancer in a CDH1 mutated background. It will also provide insight on whether the specific mutations, rather than the sheer number of mutations, is important. We additionally hope to correlate our data with malignancy.

It worth mentioning that it is important to validate the results of our screen in an orthotopic setting rather than a subcutaneous setting, for 2 reasons: 1.) orthotopic models provide several important advantages over other systems, including physiologically relevant:

progression of disease, tumor-host interactions, development of metastases, and organ-specific gene expression [Killion et. al., 1998] 2.) we aim to identify early drivers of gastric cancer, thus we expect the resulting lesions to be very small and minimally invasive and gastric cancer almost never metastasizes to the subcutaneous space suggesting that this environment is not supportive enough for minimally invasive gastric tumor growth. Therefore, it is highly likely that our engineered organoids would not grow out in the subcutaneous setting and we would miss out on validating important hits. For this same reason, it is not possible to monitor our mice by in vivo imaging techniques, as we expect the lesions to be smaller than the limit of detection.

Later in the application, we propose to test a subset of organoid lines in a subcutaneous model. However, this subset will be composed of organoid lines that contain combinations of mutations, rather than single driver mutations, and which have already been shown in either the orthotopic model or by in vitro tests to be highly malignant. This platform will not be used to confirm the driver mutations identified by our screen.

We recognize that the orthotopic technique induces more discomfort to the animals and can be more difficult to perform in a reproducible manner. However, as our results will be used to guide patient treatment, it is of the utmost importance that we mimic the physiological setting as closely as possible. In order to make this technique as reproducible as we can, we have requested mice for pilot studies not only to establish and optimize the method in our institute, but also for training animal technicians in performing this technique. We feel that these pilots are important since, with optimized protocols and well-trained technicians, the results of an experiment become more reliable and require less mice.

We would also like to test our more malignant engineered organoid lines in a subcutaneous model. This is an important step, as it will provide us with information regarding whether any of the driver mutations that we identify lead to particularly aggressive gastric cancer. If the tumors grow subcutaneously, this will allow us to both confirm the tumorigenicity of these engineered organoid lines and allow us to look at the invasiveness of the lines. It will also provide us with a tool to grow a larger number of tumor cells for further genetic and biochemical analyses. Plus, it has the added advantage that these tumors, which are likely to be more aggressive, are visible under the skin (rather than internal) and can be closely monitored to minimize animal suffering.

This project has direct clinical relevance and will allow us to provide better screening in CDH1 mutation carriers, resulting in more personalized treatment regimens - to prevent overtreatment of some patients and to provide early, aggressive treatments to those who would benefit. Once we have the information on which mutations are needed to develop gastric cancer, we will develop a genetic test which can be used to screen biopsies obtained from patients in order to identify whether the patient has developed mutations in any of these genes. This will allow us to identify cancerous cells at an early time point, hopefully even before they have developed into a tumor. Since HDGC is difficult to diagnose by current methods, we hope that this will be a step forward in screening these families and provide a tool for a more timely (i.e. delayed) removal of the stomach or, in some cases, not removing the stomach, since penetrance of the CDH1 mutation is not 100%.

For a visual overview of the project proposal, including decision points, please see the included flowchart.

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

1. Perform an unbiased screen for drivers of CDH1-mutated diffuse gastric cancer

We will use mice containing CDH1 and Cas9 conditional alleles from Stefano Annunziato (Jos Jonkers's lab at the Netherlands Cancer Institute), as well as a lentivirally delivered Cre protein, to delete CDH1 and activate Cas9 specifically in the stomach. A lentiviral gRNA library will be cloned into the same plasmid as the Cre and, therefore, will be delivered concurrently. We will do this by surgically opening the abdomen of an anesthetized mouse and delivering the magnetized Cre/gRNA library in a buffer

solution by injection into the stomach. A magnet will be placed under the stomach and, after 20 minutes, the magnet will be removed and the abdomen of the mouse surgically closed [Scherer et. al., 2002]. Mice will also be treated with analgesics before and after surgery for pain management. At 4 time points, the mice will be sacrificed and the stomachs submitted to the NKI Animal Pathology department for sectioning, H&E staining, and pathological examination. Stomach tissue will then be scraped from the slides and submitted for sequencing to identify candidate gastric cancer driver mutations.

2. Validate hits in an orthotopic model of gastric cancer

To validate the hits from the in vivo screen, we will first engineer organoid lines to contain mutations in our genes of interest using the CRISPR/Cas9 system. Then we will follow the procedures of an established orthotopic model of gastric cancer using a published electrocoagulation-based method [Bhullar et. al., 2013]. This involves placing a flexible plastic gavage tube down the throat of an anesthetized mouse. Next, a rounded-tip metal electrode is passed down the gavage tube and a low dose of electricity is applied, causing a superficial injury to the gastric mucosa. The electrode is removed and organoids in a basement membrane mimic are injected down the gavage tube to the site of superficial injury. Based on previous publications (and the results from the in vivo screen) we can expect that gastric tumors will form within 12 months and can then be used for further study (pathological examination, DNA, RNA, protein isolation, etc.) [Shimada et al., 2012; Humar et al., 2009]. We will first troubleshoot using human gastric cancer organoids from our in-lab biobank and mouse cancer cells, then we will use this system to test the tumorigenic potential of each of the mutant human and mouse organoid lines *in vivo*.

3. Test for invasiveness in a subcutaneous model of gastric cancer

We would also like to explore the malignancy of a subset of our engineered organoid lines in a subcutaneous model of gastric cancer. This will allow us to examine the invasiveness of the lines and it will provide us with a tool to grow a larger number of tumor cells for further genetic and biochemical analyses. This method involves subcutaneous injection of our organoids of interest in the rear flank of an anaesthetized mouse, followed by a waiting and monitoring period of up to 12 months (or until the resulting tumor reaches a volume of 1500mm³, whichever occurs first).

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.

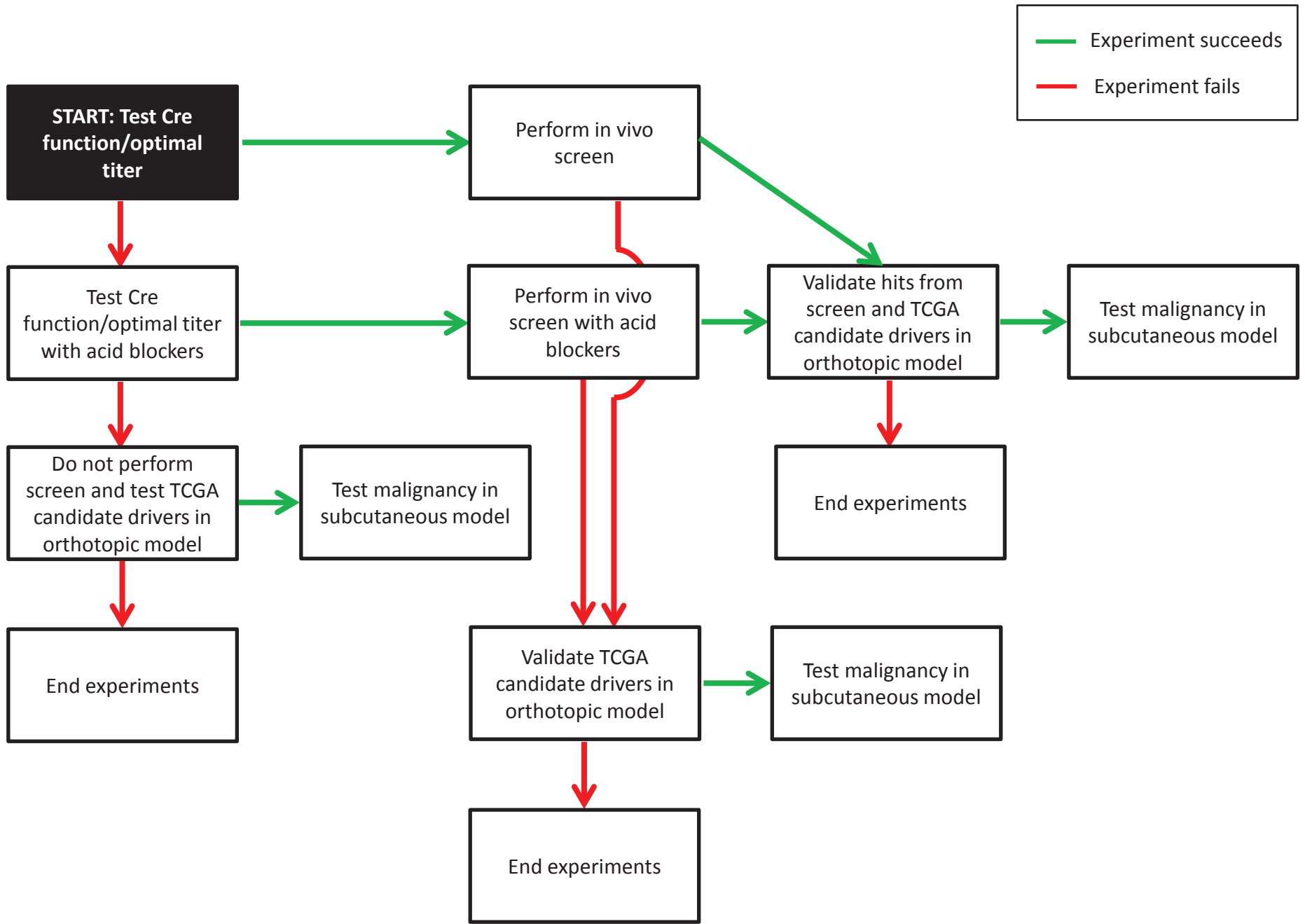
This project application is based on the identification and validation of genes which lead to the initiation of diffuse gastric cancer in a CDH1 mutated genetic background. The experiments described in this project proposal are all focused on the identification and validation of these genes, which will allow us to develop a genetic test to be used in the clinic to identify early signs of progression of gastric cancer. Therefore, the overall aim of this project is twofold: 1.) to better understand the genetics behind hereditary gastric cancer, which will allow us to 2.) explore better screening options that may be applied to the clinic. The major milestones of this project are:

1. Perform an unbiased, in vivo screen for drivers of CDH1-mutated diffuse gastric cancer.
2. Validate hits in an orthotopic model of gastric cancer.
3. Test for invasiveness in a subcutaneous model of gastric cancer.

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 | In vivo screen for drivers of gastric cancer |
| 2 | Orthotopic models of gastric cancer |
| 3 | Subcutaneous models of gastric cancer |
| 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'. | 30100 | |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis | |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure. | Serial number | Type of animal procedure |
| | 1 | In vivo screen for drivers of gastric cancer |

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 an unbiased in vivo screen to identify drivers of gastric cancer in a CDH1 mutated background.

The screen will be performed in immune competent mice containing CDH1 and Cas9 conditional alleles (from Jos Jonkers's lab at the Netherlands Cancer Institute). Importantly, these mice are known to be immune tolerant to Cas9 expression [Annunziato et al., 2016]. We will use a lentivirally delivered Cre protein to delete CDH1 and activate Cas9 specifically in the stomach, in combination with a lentiviral gRNA library, which has been cloned into the same plasmid as the lentiviral Cre (pLentiCre). In vitro tests with organoids containing a conditional CDH1 allele and electroporated with pLentiCre have confirmed that the Cre cassette is functional. We have chosen to use a lentivirally delivered Cre, rather than a traditional promoter-driven Cre, because it is not yet known which cells in the stomach epithelium are the origin of diffuse gastric cancer. We will perform the screen by combining the Cre/gRNA library mixture with commercially available magnetic particles, which are designed for in vivo use and which have been used successfully by other groups for lentiviral transduction of the stomach epithelium, indicating that transduction in the acid environment of the stomach is possible [Magnetofection, Ozbiosciences; Scherer et. al., 2002]. Then, we will surgically open the abdomen of an anesthetized mouse and deliver 0.2mL of the Cre/gRNA library mixture in a buffer solution by injection into the stomach. A commercially available magnet will be placed under the stomach and, after 20 minutes, the magnet will be removed and the abdomen of the mouse surgically closed [protocol, Ozbiosciences]. Since stomach emptying time is, on average 2 minutes (+/- 1 minute) in fasted mice, the magnet ensures that the viral particles are kept in contact with the stomach epithelium long enough for viral

transduction to occur [Roda et. al., 2010]. We have elected to use this method, rather than a gastric clamp to prevent stomach emptying during the 20 minute treatment, because it will avoid the possible risk of additional discomfort due to ischemia. Mice will also be treated with analgesics before and after surgery for pain management. At multiple time points post-treatment, the mice will be sacrificed and the stomachs submitted to the NKI Animal Pathology department for sectioning, H&E staining, and pathological examination. After scanning the slide images into a digital image storage program, areas affected by gastric cancer will be identified by a pathologist. These areas will then be manually scraped from the slides using a razor blade. DNA will be extracted from the scraped tissue and submitted for sequencing to identify candidate gastric cancer driver mutations.

In order to perform our screen using the correct conditions, which will not only ensure reliable results but will also minimize the number of mice needed and the discomfort caused to each mouse, we will need to perform some optimization experiments. First, we will need to validate the in vivo viral transduction method and ensure that our lentivirally delivered Cre is catalytically active in the acid environment of the stomach. We will also perform an experiment to determine the optimal lentiviral titer to use for in vivo transduction. Only after we have ensured that the Cre is functional, and we have identified the optimal lentiviral titer to use for in vivo transduction, will we proceed with the screen.

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

The aim of this procedure is to allow us to identify drivers of CDH1-mutated gastric cancer. We will do this using a lentivirally delivered Cre on the same plasmid as a gRNA library targeting all genes known to be mutated in CDH1-mutated gastric cancer in humans.

Nature of procedure: This procedure involves fasting the mice overnight (with free access to water) before the procedure to ensure an empty stomach in preparation for treatment with lentiviral particles the next day. Pain relief will be administered prior to surgery and post-surgery according to the NKI "Anaesthesia and Pain Relief SOP". Anaesthesia will be given by isoflurane, according to the NKI "Anaesthesia and Pain Relief SOP", then we will surgically open the abdomen of an anesthetized mouse and deliver 0.2mL of magnetized Cre/gRNA library lentivirus in a buffer solution by injection into the stomach. A commercially available magnet will be placed under the stomach and, after 20 minutes, the magnet will be removed and the abdomen of the mouse surgically closed. Mice will be treated with analgesics before and after surgery for pain management. The mouse will be kept warm during the procedure using a heating pad and body temperature will be monitored to prevent under- or overheating.

First, we will need to perform up to 3 validation experiments: 1.) to ensure that the in vivo viral transduction method works 2.) to determine whether our Cre construct results in effective Cre activity and 3.) to determine whether acid blockers enhance in vivo viral transduction. To test point 1.) and point 2.), we will perform an experiment to determine the optimal lentiviral titer to use for in vivo transduction. We will do this using mT/mG reporter mice and lentivirally delivered Cre, which will give a visual readout of transduction efficiency: if cells are green, they have received a catalytically active Cre protein; if cells are red, they have not. Since we want to perform our screen at a low multiplicity of infection, we will choose a lentiviral titer that results in not more than 50% of the cells expressing GFP. Of course, it is possible that the acidic environment of the stomach will interfere with the efficiency of lentiviral transduction. If we do not see evidence of GFP expression at any of the viral concentrations that we test, we will address point 3.) and repeat the experiment with the additional treatment of acid blockers. If treatment with acid blockers does not increase the transduction efficiency, we will not use them in the actual in-vivo screen described below, since it causes additional discomfort to the mice with no additional benefit. Alternatively, if we do not see evidence of GFP expression at any of the viral concentrations that we test, and with the inclusion of acid blockers, then we will not proceed with the screen. Once we have identified the optimal lentiviral titer to use for in vivo transduction, and whether acid blockers are needed, we will proceed with the screen.

Within 12 months, the mice will be sacrificed and the stomachs submitted to the NKI Animal Pathology department for sectioning, H&E staining, and pathological examination. After scanning the slide images into a digital image storage program, the stomach tissue will be scraped from the slides and submitted

for sequencing to identify candidate gastric cancer driver mutations.

Frequency and duration of treatment: Each mouse will be subjected to this procedure one time and we expect the procedure to last approximately 45 minutes.

Justification for the selected approach: We have chosen this approach because it will allow us to perform an unbiased screen for drivers of CDH1-mutated gastric cancer. By including gRNAs against all genes known to be mutated in CDH1-mutated gastric cancer in humans, we feel we have the best chance of identifying those genes which drive gastric cancer in a CDH1-mutated background, while using the smallest number of animals possible.

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

For the initial set-up experiment, we would like to request 20 animals per group. Since this method has not been performed previously in the institute, we expect this first experiment to require more animals than we would normally request. For all of the following set-up and optimization experiments, we would like to request 10 animals per group. This number is based on institute-wide experience with setting up mouse models of cancer.

For our in vivo screen, we would like to request 5 animals per control group and 10 animals per experimental group. As a supporting calculation we used a One Sided T-test. In this calculation, we assume a mean of 1 for the control group (number of significantly enriched gRNAs) and 10 for the experimental groups, and a variance of 1 and 5, respectively.

B. The animals

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

Species: mus musculus.

Origin: mT/mG mice (own breeding or commercial supplier) and mice containing conditional alleles for CDH1 and Cas9 (own breeding).

Life stage: adult (both male and female, in proportional quantities).

Justification: Mice are a commonly used animal model in oncology studies due to their short generation time and ease of genetic manipulation. Mice also share a similar organ structure to humans and have considerable genetic conservation as compared to humans. Furthermore, much research using mice has been conducted, resulting in the availability of many genome-wide data sets and advanced tools for genetic and biological manipulation, including tumor models, cell lines, and xenograft platforms.

Estimated numbers for in-vivo screen:

In vivo screen set-up pilot:

As we would like to transduce the cells of the stomach epithelium at a low multiplicity of infection, we will first need to experimentally determine the optimal viral titre to use. We can do this with a lentiviral Cre protein and mT/mG mice, which expresses membrane-targeted tandem dimer Tomato (mT) prior to Cre-mediated excision and membrane-targeted green fluorescent protein (mG) after excision [Muzumdar et. al. 2007]. Therefore, cells which receive a catalytically active viral Cre protein will become green. We will aim for a viral titre which results in GFP expression in the greatest percentage, but not more than 50%, of the stomach epithelial cells. To determine the percentage of stomach cells which have received an active lentiviral Cre, we will sacrifice the mice after 4 days in order to remove the stomachs for molecular examination.

Based on published experiments by other groups, we would like to test a range of lentiviral titres from 10^3 to 10^{11} PFU per mL [Afrazi et. al., 2014; Polyak et. al., 2008; Scherer et. al., 2002].

Since all new procedures have a learning curve, and we need to establish this method in our institute, we would like to use 20 animals per group in 6 groups, covering a range of viral titers:

1. Buffer without lentiviral Cre
2. Lentiviral Cre in buffer at viral titre #1
3. Lentiviral Cre in buffer at viral titre #2
4. Lentiviral Cre in buffer at viral titre #3
5. Lentiviral Cre in buffer at viral titre #4
6. Lentiviral Cre in buffer at viral titre #5

Therefore, we will use 120 mice for this pilot study.

If we find that the cells of the stomach are being transduced at a very low efficiency, it is possible that this is due to the acidic environment of the stomach dissolving the lentiviral particles or inactivating the Cre protein. Therefore, in this case, we will repeat this set-up pilot in mT/mG mice with the addition that we will also treat the mice with acid blockers. We will follow a previously published protocol, whereby mice receive subcutaneous pantoprazole (0.4 mg in 0.2 mL) twice daily for 2 days prior to the lentiviral infusion [Stiefel et. al., 2006]. Then we will follow the same procedure as above.

Again, based on published experiments by other groups, we would like to test a range of lentiviral titres from 10^3 to 10^{11} PFU per mL [Afrazi et. al., 2014; Polyak et. al., 2008; Scherer et. al., 2002]. In this pilot study, we would like to use 10 animals per group in 6 groups, covering a range of viral titers:

1. Buffer without lentiviral Cre
2. Lentiviral Cre in buffer at viral titre #1
3. Lentiviral Cre in buffer at viral titre #2
4. Lentiviral Cre in buffer at viral titre #3
5. Lentiviral Cre in buffer at viral titre #4
6. Lentiviral Cre in buffer at viral titre #5

Therefore, we will use 60 mice for this pilot study, if it is necessary. If treatment with acid blockers does not increase the transduction efficiency, we will not use them in the actual in-vivo screen described below, since it causes additional discomfort to the mice with no additional benefit.

In-vivo screen training:

As we may make advantage of the Animal Intervention Unit at the NKI, which is available to perform experiments on behalf of researchers, we would like to train up to a total of 4 staff from the Intervention Unit. We will perform the experiments as described above (with or without acid blockers, as needed, based on the results of the experiment above) and would like to use 10 mT/mG mice per trainee, which we think will allow us sufficient practice in establishing the method. We will perform these training sessions using the lentiviral Cre titer identified in the pilot experiments above. **We feel this training is important since, with well-trained technicians, the results of an experiment become more reliable and require less mice.** Since this is a training step and not an experiment which requires extensive controls, we will use only a single group of mice:

1. Lentiviral Cre in buffer at previously identified viral titre

To determine the percentage of stomach cells which have received an active lentiviral Cre, we will sacrifice the mice after 4 days in order to remove the stomachs for molecular examination.

Please note that we do not plan to train all 4 people at once, but training will be done as needed over a period of 5 years. Therefore, we will use a *maximum* of 40 mice for this training.

In vivo screen experimental set-up:

For the in vivo screen, we will use mice containing a conditional CDH1 and Cas9 allele. If necessary, based on the findings of the acid-blocker experiment described above, mice will receive subcutaneous pantoprazole (0.4 mg in 0.2 mL) twice daily for 2 days prior to the procedure [Stiefel et. al., 2006].

We would like to include 6 time points to ensure that we do not miss any hits – either particularly aggressive hits or hits which result in later development of gastric cancer. Based on previous publications, we can expect a time range between 2-12 months is reasonable [Shimada et al., 2012; Humar et al., 2009]. A typical study will contain 12 control groups (one negative control group at each

time point and one positive control group at each time point), with 5 mice per group:

1. Mice treated with buffer only and sacrificed at post-treatment time point 1
2. Mice treated with buffer only and sacrificed at post-treatment time point 2
3. Mice treated with buffer only and sacrificed at post-treatment time point 3
4. Mice treated with buffer only and sacrificed at post-treatment time point 4
5. Mice treated with buffer only and sacrificed at post-treatment time point 5
6. Mice treated with buffer only and sacrificed at post-treatment time point 6
7. Mice treated with lentiviral Cre and gRNAs against TP53 and sacrificed at post-treatment time point 1
8. Mice treated with lentiviral Cre and gRNAs against TP53 and sacrificed at post-treatment time point 2
9. Mice treated with lentiviral Cre and gRNAs against TP53 and sacrificed at post-treatment time point 3
10. Mice treated with lentiviral Cre and gRNAs against TP53 and sacrificed at post-treatment time point 4
11. Mice treated with lentiviral Cre and gRNAs against TP53 and sacrificed at post-treatment time point 5
12. Mice treated with lentiviral Cre and gRNAs against TP53 and sacrificed at post-treatment time point 6

And 6 experimental groups, with 10 mice per group:

1. Mice treated with lentiviral Cre and the experimental gRNA library and sacrificed at post-treatment time point 1
2. Mice treated with lentiviral Cre and the experimental gRNA library and sacrificed at post-treatment time point 2
3. Mice treated with lentiviral Cre and the experimental gRNA library and sacrificed at post-treatment time point 3
4. Mice treated with lentiviral Cre and the experimental gRNA library and sacrificed at post-treatment time point 4
5. Mice treated with lentiviral Cre and the experimental gRNA library and sacrificed at post-treatment time point 5
6. Mice treated with lentiviral Cre and the experimental gRNA library and sacrificed at post-treatment time point 6

Therefore, one repetition of the *in vivo* screen will require 120 mice. We would like to repeat the experiment three independent times, which results in a total of 360 mice over 5 years.

The total number of mice requested for the in-vivo screen section of the proposal is: 580

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:

In silico research will be performed and critically evaluated prior to beginning any in vivo work. However,

as cancer is a complex disease, and we hope to translate our findings to the clinical setting, our experiments cannot be limited to results from in silico analysis. Organoids, cells, and computer models are not yet sophisticated enough to mimic factors such as the stroma, oxygen supply, the immune system, and metabolism, and therefore cannot yet replace in vivo screens.

Reduction:

We have elected to perform an unbiased screen for drivers of gastric cancer, as this provides us with a balance between having the best chance of identifying those genes which drive gastric cancer in a CDH1-mutated background, while using the smallest number of animals possible. The proposed number of animals per group (n=5-20 animals) is based on institute-wide experience with these types of experiments, as well as statistical calculations. Further reduction of the number of animals per cohort would decrease the statistical power of the experiments.

Refinement:

By performing pilots to set up the method, to optimize the method, and to properly train personnel, we aim to minimize the discomfort to the animals involved. Additionally, we will administer analgesics according to the NKI "Anaesthesia and Pain Relief SOP" and mice will be closely monitored for signs of discomfort. If we have to test the effect of acid blockers and we find that their use confers no experimental advantage, we will not use them in the actual in-vivo screen described below, since the extra treatment will, by definition, cause additional discomfort to the mice. The procedure will be performed only once, under anaesthesia, and in an appropriate volume (0.2mL). We have also chosen this procedure over another available procedure involving a gastric clamp to prevent stomach emptying, which could cause ischemia and result in additional discomfort to the mice. Mice will be closely monitored during the immediate post-surgical period.

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

We realize that the procedures described in this appendix will inevitably cause stress and suffering to the animals. In order to minimize these effects, we will adhere to the general and internationally accepted rules (Code of Practice) of handling lab animals in oncology [Workman et. al., 2010]. Under these rules, the animals will be humanely killed when any humane endpoint is reached. Additionally, mice will be anaesthetized during the surgical procedure and treated with analgesics before and after surgery for pain management according to the NKI "Anaesthesia and Pain Relief SOP". Furthermore, mice are housed in state-of-the-art, individually ventilated cages. As standard procedure, mice in our facility are group-housed and provided with cage enrichment, bedding, and free access to food and water. To minimize adverse effects on the environment, procedures requiring the use of lentivirus will be done in a special ML-II certified sub-facility within our animal facility.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Within the NKI, we have developed a standard operation protocol that describes the most appropriate methods for anaesthesia and analgesia for each (surgical) procedure. This protocol has been developed by the animal welfare officer of the NKI and may be subject to change when new concepts or ideas about optimal anaesthesia/analgesia evolve. Based on the current protocol, the most appropriate anaesthetic for our application is isoflurane and analgesics are Rimadyl and Temgesic.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Similar to cancer patients, animals carrying tumors in internal organs may develop dysfunction of the involved organs, or other complications due to metastasis (although we do not expect this to occur as we aim to induce minimal mutational burden and looking for initial drivers of tumorigenesis). Although, based on previously published results [Shimada et al., 2012; Humar et al., 2009], we expect that all mice will be sacrificed before a humane endpoint is reached, the mice may undergo moderate discomfort due to tumor growth. Specifically in the case of gastrointestinal tumors, obstruction of the gastrointestinal tract may occur. Alternatively, the mice may experience weight loss, blood in feces, diarrhea, or obstruction of the GI tract. Mice which undergo surgery may experience improper wound healing or infection due to the surgical procedure. Should any signs of discomfort be detected, the mouse will be observed daily and the decision to sacrifice the mouse will be made with the help of the NKI animal welfare officers. If a humane endpoint is reached, the mouse will be sacrificed immediately

Explain why these effects may emerge.

These effects are an unavoidable consequence of tumor growth.

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

In general, the effects on the wellbeing of the mice due to tumor growth cannot be completely avoided. In order to minimize the burden on the mice, they will be monitored for signs of distress (hunched back, lack of grooming, blood in feces, signs of infection, significant weight loss) and killed when any of the humane endpoints described below are met. Nevertheless, unforeseen complications may arise. In such cases, we will attempt to find solutions which minimize the impact of unforeseen complications, for example, by providing easy access to food (mush-feeding), taking into account the humane endpoints below.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

We will adhere to the Code of Practice of lab animals used in oncology, in line with internationally agreed rules (see P. Workman et al. Guidelines for welfare and use of animals in cancer research. Br J Cancer 2010; 102: 1555-1577). In general, the most important humane endpoints that apply are:

- Lack of wound healing after surgery.
- Signs of infection after surgery.
- Weight loss of more than 20% of the initial body weight, measured from the start of treatment of adult animals.
- Severe abnormal breathing.
- Evidence of abnormal stool (for example, blood in the stool).
- Severe abnormal behavior (for example: lack of grooming, hunched posture, pilo-erection).

Indicate the likely incidence.

For the in vivo screen, we expect that all mice will develop gastric cancer. But, since we are infecting at a low MOI and previously identified (i.e. the most aggressive) drivers take 6-9 months for gastric cancer to form, we do not expect any mice to reach a humane endpoint [Shimada et al., 2012; Humar et al., 2009].

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').

Our in vivo screen involves surgery under anaesthesia and the development of tumors in the stomach, an internal organ. Although we expect that all mice will be sacrificed before a humane endpoint is reached, the mice may undergo moderate discomfort due to tumor growth, including weight loss, blood in feces, diarrhea, or obstruction of the GI tract. As all mice will undergo surgery under anaesthesia and are also expected to develop gastric cancer, we expect 100% of our mice to experience moderate discomfort.

Additional discomfort due to procedures:

Simple but frequent handlings, like weighing: mild discomfort.

We expect that mice under this appendix will experience mild, moderate, and severe discomfort in: 0, 100, and 0% of the cases, respectively.

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 do a full pathology exam on the tumors, and necropsy on the mice (to look for metastases), it is necessary to remove the affected organ(s). Therefore, the mice will need to be sacrificed at the end of the experiment.

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

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

x Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

| | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 30100 | |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis | |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure. | Serial number 2 | Type of animal procedure Orthotopic models of gastric cancer |

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 validation of candidate drivers of CDH1-mutated gastric cancer using an in vivo orthotopic mouse model.

For this, we will engineer CDH1-mutated, but non-cancerous, gastric organoid lines to contain mutations in candidate genes in order to test the ability of each line to form tumors in an orthotopic mouse model of gastric cancer. We will prioritize candidates based on the significance of enrichment of each gRNA, the frequency which these mutations are found in CDH1 mutated gastric cancer patients, and the function of each candidate gene. In order to confirm that the hits we identify in mice translate to the patient setting, we will validate our hits with both mouse and human CDH1 mutant gastric organoids. Accordingly, we will use both CDH1/Cas9 conditional mouse gastric organoid lines, and CDH1 mutant human gastric organoid lines, both of which we already have growing in the lab, to validate our hits. For this validation test, we will create organoid lines with targeted mutations in these genes using the CRISPR/Cas9 genome editing system. Then we will test the tumorigenic potential of the individual lines in a non-surgical orthotopic mouse model [Bhullar et al., 2010]. The technology for this method is in place in collaboration with the group in the United States that developed the method and we will troubleshoot the system first using organoids/cells that are known to grow well in vitro. If we are unable to optimize the system at this stage, we will not proceed.

It worth mentioning that it is highly likely that our engineered organoids would not grow out in the subcutaneous setting and we would miss out on validating important hits. For this same reason, it is not possible to monitor our mice by in vivo imaging techniques, as we expect the

lesions to be smaller than the limit of detection.

Gastric tumors are expected to form within 12 months and can then be used for further study (pathological examination, DNA, RNA, protein isolation, etc.) [Shimada et. al., 2012; Humar et. al., 2009]. At multiple time points after orthotopic implantation, but within 12 months after the procedure, the mice will be sacrificed and submitted to the NKI Mouse Pathology Department for pathological examination to determine whether tumors have formed.

We would also like to identify combinations of mutations which are likely to result in more aggressive gastric carcinomas. We will do this by creating an allelic series ranging from single, to all possible combinations of double and triple mutations of those genes which are identified as bona fide hits in the previous experiment. To select the genes which will be tested in this experiment, we will take into account the malignancy of the mutations observed in the previous orthotopic validation experiment, as well as the frequency with which the genes are mutated in patient samples. Included in our experimental groups, we will also perform this experiment with three genes previously identified as drivers of gastric cancer by the TCGA and which also co-occur with CDH1 mutations [Wang et. al., 2014; cBioPortal]. These organoids will then be orthotopically implanted and allowed to grow for up to 12 months. At multiple time points within the 12 month timeframe, mice will be sacrificed and submitted to the NKI Animal Pathology Department for pathological evaluation of gastric tumor growth. This will provide us information on the critical limit regarding the number of mutations needed in order for normal gastric tissue to transition to gastric cancer in a CDH1 mutated background. It will also provide insight on whether the specific mutations, rather than the sheer number of mutations, is important. We additionally hope to correlate our data with malignancy.

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

The aim of our this appendix is to validate candidate drivers of CDH1-mutated gastric cancer using an orthotopic mouse model. The technology for this method is in place in collaboration with the group in the United States that developed the method.

Nature of procedure: This procedure involves fasting the mice overnight (with free access to water) before the procedure to ensure an empty stomach in preparation for implantation of the human organoids the following day. Anaesthesia will be given by isoflurane, according to the NKI "Anaesthesia and pain Relief" SOP, then an 18g, flexible, polyethylene gavage tube of 8cm in length is placed down the throat of a lightly anesthetized mouse until it contacts the stomach mucosa. The smooth passage of the gavage tube will be ensured to prevent injury to the esophagus and stomach during the placement.

Next, a rounded-tip 22g nickel-chromium electrode of a length just greater than the length of the gavage tube is passed down the gavage tube. The tip of the electrocoagulation electrode is rounded to prevent injury to the stomach mucosa. It is also designed so that the rounded tip of the electrode protrudes just beyond the end of the gavage tube. In this manner, the gavage tube protects the gastroesophageal mucosa during passage of the electrode into the stomach. It also provides insulation from the electricity which will be passed down the electrode, except for the rounded, protruding tip. 10W of electricity is then applied to the electrode for 1 second using a Bovie device. This causes a superficial injury to the gastric mucosa. Then, the electrode is removed and organoids in a basement membrane matrix are injected down the gavage tube to the site of superficial injury. In order to avoid movement of the gavage tube as much as possible, we will design a custom restraint platform to hold the mouse in a fixed position during the procedures. In this way, we hope to increase the tumor take rate over the published tumor take rate of ~70%, thereby requiring that we use less animals.

In the original paper, 10^6 cells / 0.2mL of basement membrane matrix were used. As organoids are different than cell lines, we may have to adjust the concentration of organoid cells / 0.2 mL basement membrane matrix in a small pilot experiment (included in the numbers for "Organoid numbers pilot" below). We expect that concentrations in the range of 10^4 to 10^7 organoid cells / 0.2mL of basement membrane matrix will be used in our final experiments. The gavage tube is then removed and the mice are allowed access to water and food ad libitum 2 hours after the procedure. Gastric tumors are expected

form within 12 months and can then be used for further study (pathological examination, DNA, RNA, protein isolation, etc.). Within 12 months, the mice will be sacrificed and submitted to the NKI Mouse Pathology Department for pathological examination to determine whether tumors have formed in the stomach and whether there is any evidence of metastasis.

We will first troubleshoot using human gastric cancer organoids from our in-lab biobank, and a mouse cancer cell line, both of which are known to grow well in vitro (included in the numbers for "Model set-up" below), then we will use this system to test the tumorigenic potential of each of the mutant human and mouse organoid lines in vivo. If we are unable to optimize the system at this point, then we will not proceed.

Frequency and duration of treatment: Each mouse will be subjected to this procedure one time and we expect the procedure to last approximately 15 minutes.

Justification for the selected approach: We have chosen this approach to validate our hits for 3 reasons: 1.) Orthotopic models provide several important advantages over other systems, including physiologically relevant: progression of disease, tumor-host interactions, development of metastases, and organ-specific gene expression [Killion et. al., 1998]. 2.) We aim to identify drivers of gastric cancer, thus we expect the resulting lesions to be very small and minimally invasive. Gastric cancer almost never metastasizes to the subcutaneous space suggesting that this environment is not supportive enough for minimally invasive gastric tumor growth. Therefore, it is highly likely that our engineered organoids would not grow out in the subcutaneous setting and we would miss out on validating important hits. 3.) Although several orthotopic models of gastric cancer are available, we have elected to use the published electrocoagulation-based orthotopic mouse model of gastric cancer, as this model most closely mimics the development of gastric cancer in the human setting and also does not require surgery, resulting in less discomfort to the mice than other available methods, which all require surgery.

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

For the pilot experiments to set up the method, and also for training procedures, we would like to request 10 animals per group. For the pilot experiments, this number is based on institute-wide experience with setting up new mouse cancer models. For the training experiments, we feel that 10 mice per trainee will allow sufficient practice and will also allow us to calculate the success of the method in the hands of each trainee.

For the validation of our candidate genes using engineered organoids, we would like to use group sizes of 9 animals for the control groups and 16 animals for each targeted organoid line.

As a supporting calculation we used a One Sided T-test. We assumed a mean of 1 for the control group (the number of mice with tumors) and 10 for the experimental groups, and a variance of 1 and 5, respectively. However, since the published tumor take rate of this orthotopic model is 70%, and we will require a take rate of >60%, we will therefore use 9 total animals per control group ($5 / 60\% = 8.33$) and 16 total animals per experimental group ($10 / 60\% = 16.66$).

B. The animals

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

Species: mus musculus.

Origin: mice of a genetic background matching the cancer cell line used for the pilot test (own breeding or commercial supplier); NOD-SCID (own breeding or commercial supplier); mice containing conditional alleles for CDH1 and Cas9 (own breeding).

Life stage: adult (both male and female, in proportional quantities).

Justification: Mice are a commonly used animal model in oncology studies due to their short generation time and ease of genetic manipulation. Mice also share a similar organ structure to humans and have

considerable genetic conservation as compared to humans. Furthermore, much research using mice has been conducted, resulting in the availability of many genome-wide data sets and advanced tools for genetic and biological manipulation, including tumor models, cell lines, and xenograft platforms.

Orthotopic model set-up pilot and training:

New orthotopic models of (human or mouse) cancer that have not been used previously in our facility need to be both established and tested to determine the tumor take rate. (We will perform a second pilot experiment (see below) to establish the optimal number of organoid cells needed). For this purpose, we would like to train a total of 5 people, including staff from the Intervention Unit, using 10 mice per trainee (the exact strain will depend on the mouse cancer line which is selected), which we think will allow us sufficient practice in establishing the method, and 1×10^7 cells in 0.2mL of basement membrane matrix, which is 10 times higher than the published number using cell lines [Bhullar et. al., 2010]. For the training, we will use mouse cancer cells, as these cells are expected to develop into gastric cancer within one to two months. Within two months after the procedure, the mice will be sacrificed, and stomachs will be examined for evidence of gastric cancer. **We feel this training pilot is important, since with well-trained technicians, the results of an experiment become more reliable and require less mice.** As the published take rate is 70%, as a measure of competency after training, we will require a take rate of >60%. Since this is a training step and not an experiment which requires extensive controls, we will use only a single organoid line, which we already know grows well in vitro:

1. mouse cancer cells with electrocoagulation

Please note that we do not plan to train all 5 people at once, but training will be done as needed over a period of 5 years. Therefore, we will use a *maximum* of 50 mice for this pilot study and training.

Orthotopic model organoids numbers pilot:

As the previous publication used SNU-16 human gastric cancer cells for their experiments, which is a different cell line and genetic background (and a different species, in the case of our mouse organoid experiments), we may have to adjust the published concentration [Bhullar et. al., 2010] of organoid cells in 0.2 mL basement membrane matrix in a small pilot experiment. We expect that concentrations in the range of 10^4 to 10^7 organoid cells in 0.2mL of basement membrane matrix will be used in our final experiments. In this pilot study, we would like to test the optimal number of cells to use for our mouse and human experiments. For the mouse cell number pilot, we will use a mouse strain of the same background as the cancer cell line that we select for use. This choice will depend on cell line availability, as well as the growth rate of the cell line. For the human cell number pilot, we will use NOD-SCID animals. We will choose a human gastric cancer organoid line from our in-lab biobank that is known to grow well in vitro. We would like to use 16 adult animals per group (10 mice desired / 60% take rate = 16 mice) in 8 groups, covering a range of organoid concentrations:

1. 1×10^7 CDH1 mutant, but non-cancerous, mouse or human gastric organoids
2. mouse cancer cells or human gastric cancer organoids (from our in-lab biobank) at concentration 1
3. mouse cancer cells or human gastric cancer organoids (from our in-lab biobank) at concentration 2
4. mouse cancer cells or human gastric cancer organoids (from our in-lab biobank) at concentration 3
5. mouse cancer cells or human gastric cancer organoids (from our in-lab biobank) at concentration 4
6. 1×10^7 mouse cancer cells or human gastric cancer organoids (from our in-lab biobank) without electrocoagulation
7. 1×10^7 CDH1 mutant, but non-cancerous, mouse or human gastric organoids without electrocoagulation
8. electrocoagulation without organoids

Therefore, we will use 256 mice for this pilot study.

Orthotopic model experimental set-up:

Once we have identified the correct number of organoid cells to use (in 0.2mL basement membrane matrix), we will perform our experiments. Our human (in adult NOD-SCID mice) and mouse (in adult mice containing a conditional CDH1 and Cas9 allele) studies will contain 20 control groups, with 9 mice per group:

1. CDH1 mutant, but non-cancerous, mouse or human gastric organoids at time point 1
2. mouse cancer cells or human gastric cancer organoids (from our in-lab biobank) at time point 1
3. mouse cancer cells or human gastric cancer organoids (from our in-lab biobank) without electrocoagulation at time point 1
4. CDH1 mutant, but non-cancerous, mouse or human gastric organoids without electrocoagulation at time point 1
5. electrocoagulation without organoids at time point 1
6. CDH1 mutant, but non-cancerous, mouse or human gastric organoids at time point 2
7. mouse cancer cells or human gastric cancer organoids (from our in-lab biobank) at time point 2
8. mouse cancer cells or human gastric cancer organoids (from our in-lab biobank) without electrocoagulation at time point 2
9. CDH1 mutant, but non-cancerous, mouse or human gastric organoids without electrocoagulation at time point 2
10. electrocoagulation without organoids at time point 2
11. CDH1 mutant, but non-cancerous, mouse or human gastric organoids at time point 3
12. mouse cancer cells or human gastric cancer organoids (from our in-lab biobank) at time point 3
13. mouse cancer cells or human gastric cancer organoids (from our in-lab biobank) without electrocoagulation at time point 3
14. CDH1 mutant, but non-cancerous, mouse or human gastric organoids without electrocoagulation at time point 3
15. electrocoagulation without organoids at time point 3
16. CDH1 mutant, but non-cancerous, mouse or human gastric organoids at time point 4
17. mouse cancer cells or human gastric cancer organoids (from our in-lab biobank) at time point 4
18. mouse cancer cells or human gastric cancer organoids (from our in-lab biobank) without electrocoagulation at time point 4
19. CDH1 mutant, but non-cancerous, mouse or human gastric organoids without electrocoagulation at time point 4
20. electrocoagulation without organoids at time point 4

And 14-21 experimental groups, at 4 time points per group, with 16 mice per group, which will be made up of various combinations of 1, 2, or 3 mutations (taken from the list of hits from our screen and from the list of drivers previously identified by the TCGA [Wang et. al., 2014; cBioPortal]):

1. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 1
2. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 2
3. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 3
4. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 4
5. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 5
6. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 6
7. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 7
8. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 8
9. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 9
10. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 10
11. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 11
12. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 12
13. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 13
14. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 14
15. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 15
16. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 16
17. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 17
18. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 18
19. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 19
20. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 20
21. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 21

This results in a maximum of 1344 animals per experiment. Since we will perform studies with

both human and mouse targeted organoids, we will use 2688 mice in these studies over 5 years.

The total number of mice requested for the orthotopic section of this proposal is: 2994.

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:

Cell culture experiments will be performed prior to beginning any in vivo work. The results of these experiments will be critically evaluated and in vivo tests will be undertaken only if the cell culture experiments are considered to be sufficiently promising. However, as cancer is a complex disease, and we hope to translate our findings to the clinical setting, our experiments cannot be limited to results from cell culture alone. Organoids, cells, and computer models are not yet sophisticated enough to mimic factors such as the stroma, oxygen supply, the immune system, and metabolism, and therefore cannot yet replace in vivo tumor models.

Reduction:

The proposed number of animals per group (n=9-16 animals) is based on institute-wide experience with these types of experiments, as well as statistical calculations. Further reduction of the number of animals per cohort would decrease the statistical power of the experiments.

Refinement:

By performing pilots to set up the method, to optimize the method, and to properly train personnel, we aim to minimize the discomfort to the animals involved. Additionally, we have elected to use an electrocoagulation-based orthotopic model of gastric cancer which (in contrast to other existing

orthotopic models of gastric cancer) is a non-surgical method and, therefore, causes less discomfort to the mice. The procedure will be performed only once, under anaesthesia, and mice will be closely monitored in the period immediately following completion of the procedure.

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

We realize that the procedures described in this appendix will inevitably cause stress and suffering to the animals. In order to minimize these effects, we will adhere to the general and internationally accepted rules (Code of Practice) of handling lab animals in oncology [Workman et. al., 2010]. Under these rules, the animals will be humanely killed when any humane endpoint is reached. Additionally, for procedures Furthermore, mice are housed in state-of-the-art, individually ventilated cages. As standard procedure, mice in our facility are group-housed and provided with cage enrichment, bedding, and free access to food and water.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Within the NKI, we have developed a standard operation protocol that describes the most appropriate methods for anaesthesia and analgesia for each procedure. This protocol has been developed by the animal welfare officers of the NKI and may be subject to change when new concepts or ideas about optimal anaesthesia/analgesia evolve. Based on the current protocol, the most appropriate anaesthetic for our application is isoflurane and analgesics are Rimadyl and Temgesic.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Similar to cancer patients, animals carrying tumors in internal organs may develop dysfunction of the involved organs, or other complications due to metastasis (although this has not been seen previously in the orthotopic model that we will use). Although, based on previously published results, we expect that all mice will be sacrificed before a humane endpoint is reached, the mice may undergo moderate discomfort due to tumor growth. Specifically in the case of gastrointestinal tumors, obstruction of the gastro-intestinal tract may occur. Alternatively, the mice may experience weight loss, blood in feces, diarrhea, or obstruction of the GI tract. Should any signs of discomfort be detected, the mouse will be observed daily and the decision to sacrifice the mouse will be made with the help of the NKI animal welfare officers. If a humane endpoint is reached, the mouse will be sacrificed immediately

Explain why these effects may emerge.

These effects are an unavoidable consequence of tumor growth.

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

In general, the effects on the wellbeing of the mice due to tumor growth cannot be completely avoided. In order to minimize the burden on the mice, they will be monitored weekly for signs of distress (hunched back, lack of grooming, blood in feces, signs of infection, significant weight loss) and killed when any of the humane endpoints described below are met. Nevertheless, unforeseen complications may arise. In such cases, we will attempt to find solutions which minimize the impact of unforeseen complications, for example, by providing easy access to food (mush-feeding), taking into account the humane endpoints below.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

We will adhere to the Code of Practice of lab animals used in oncology, in line with internationally agreed rules (see P. Workman et al. Guidelines for welfare and use of animals in cancer research. Br J Cancer 2010; 102: 1555-1577). In general, the most important humane endpoints that apply are:

- Weight loss of more than 20% of the initial body weight, measured from the start of treatment of adult animals.
- Severe abnormal breathing.
- Evidence of abnormal stool (for example, blood in the stool).
- Severe abnormal behavior (for example: lack of grooming, hunched posture, pilo-erection).

Indicate the likely incidence.

Since the published tumor take rate of our orthotopic mouse model of human or mouse cancer is 70%, we expect <70% of our non-control mice to develop gastric cancer. However, based on previously published results [Shimada et. al., 2012; Humar et. al., 2009], we do not expect humane endpoints to be reached.

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').

Our orthotopic mouse model of human or mouse gastric cancer involves anaesthetizing the mouse, oral gavage, and application of a light electrical current, prior to administration of our cells of interest in a basement membrane matrix. Not all of the mice will be treated with potentially tumorigenic organoids, but since all mice in this appendix will be subjected to the electrocoagulation procedure, which requires anaesthesia, we expect that all mice in this appendix will experience moderate discomfort.

Additional discomfort due to procedures:

Simple but frequent handlings, like weighing: mild discomfort.

Therefore, we expect that mice under this appendix will experience mild, moderate, and severe discomfort in: 0, 100, and 0% of the cases, respectively.

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 do a full pathology exam on the tumors, and necropsy on the mice (to look for metastases), it is necessary to remove the affected organ(s). Therefore, the mice will need to be sacrificed at the end of the experiment.

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

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

Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

| | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'. | 30100 | |
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Het Nederlands Kanker Instituut - Antoni van Leeuwenhoek Ziekenhuis | |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure. | Serial number | Type of animal procedure |
| | 3 | Subcutaneous models of gastric cancer |

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 would like to test organoid lines that are engineered to contain mutations in candidate drivers of gastric cancer, and which are suspected to be more malignant, in a subcutaneous model. This is an important step in our project, as it will provide us with information regarding whether any of the driver mutations that we identify lead to particularly aggressive gastric cancer. This is necessary information if we are to advise patients on whether or not to undergo gastrectomy or to follow a more conservative treatment regimen. This step will allow us not only to confirm the tumorigenicity of these engineered organoid lines, but it will also allow us to look at the invasiveness of the lines. Additionally, it will provide us with a tool to grow a larger number of tumor cells for further genetic and biochemical analyses. And, since we expect the engineered organoid lines that we select for this experiment to be more malignant, the subcutaneous model will cause the least amount of discomfort to the mice since the tumors that form will be visible under the skin and can be closely monitored.

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

Nature of procedure: This procedure involves injecting organoids of interest subcutaneously into an anaesthetized mouse. Anaesthesia will be given by isoflurane, according to the NKI "Anaesthesia and Pain Relief SOP" and organoids will be injected into the rear flank. Mice will be sacrificed within 12 months of injection, or once the tumor reaches a size of 1500mm³, whichever occurs first. The resulting tumors will be submitted to the NKI Mouse Pathology Department for pathological examination.

Frequency and duration of treatment: Each mouse will be subjected to this procedure one time and we expect the procedure to last not more than 15 minutes.

Justification for the selected approach: We have chosen this approach for three reasons 1.) it is a well-established and well-accepted model of tumor growth, 2.) it will allow us to test the ability of our targeted organoids to form tumors outside of their tissue of origin, and 3.) it will allow us to do so with minimal discomfort to the mice since the tumors that may form are visible externally, allowing us to closely monitor tumor growth.

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

For the pilot experiment to set up the method, we would like to request 10 animals per group. This number is based on institute-wide experience with setting up new mouse cancer models.

For the experiments to test the malignancy of our engineered organoid lines, we would like to use group sizes of 5 animals for the control groups and 10 animals for each targeted organoid line.

As a supporting calculation we used a One Sided T-test. We assumed a mean of 1 for the control group (the number of mice with tumors) and 10 for the experimental groups, and a variance of 1 and 5, respectively.

B. The animals

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

Species: mus musculus.

Origin: NOD/SCID (own breeding or commercial supplier); mice containing conditional alleles for CDH1 and Cas9 (own breeding).

Life stage: adult (both male and female, in proportional quantities).

Justification: Mice are a commonly used animal model in oncology studies due to their short generation time and ease of genetic manipulation. Mice also share a similar organ structure to humans and have considerable genetic conservation as compared to humans. Furthermore, much research using mice has been conducted, resulting in the availability of many genome-wide data sets and advanced tools for genetic and biological manipulation, including tumor models, cell lines, and xenograft platforms.

Subcutaneous model set-up pilot and organoid numbers pilot:

New models of (human or mouse) cancer that have not been used previously in our facility need to be tested to establish the tumor take rate and the optimal number of cells to inject. While the subcutaneous method is commonly used in our institute, it has not yet been tested for use with gastric organoids. Based on the numbers reported in a previously published model [Drost et. al., 2015], we will inject 2×10^5 to 2×10^7 gastric cancer organoids, which are known to grow well in vitro, in 100ul total volume (1:1 basement membrane matrix:media). We will use a range, rather than simply using the previously published number, as the previously published model was performed with colorectal organoids. Therefore, we would like to ensure that the optimal number of organoids is identified for use with gastric cancer. For this purpose, we would like to use 10 adult NOD-SCID mice per group:

1. 2×10^7 CDH1 mutant, but non-cancerous, human gastric organoids
2. human gastric cancer organoids (from our in-lab biobank) at concentration 1
3. human gastric cancer organoids (from our in-lab biobank) at concentration 2
4. human gastric cancer organoids (from our in-lab biobank) at concentration 3
5. 2×10^7 human gastric cancer organoids (from our in-lab biobank) without electrocoagulation
6. vehicle injection without organoids

Therefore, we will use 60 mice for this pilot study.

Subcutaneous model experimental set-up:

Once we have identified the correct number of organoid cells to use (in 0.1mL basement membrane

matrix), we will perform our experiments. A typical human (in adult NOD-SCID mice) or mouse (in adult mice containing a conditional CDH1 and Cas9 allele) study will contain 3 control groups, with 5 mice per group:

1. CDH1 mutant, but non-cancerous, (human or mouse) gastric organoids
2. human gastric cancer organoids (from our in-lab biobank) or mouse cancer cells
3. vehicle injection without organoids

and 14-21 experimental groups, with 10 mice per group, which will be made up of various combinations of one, two, three, or four mutations (taken from the results of the orthotopic model validation experiment in Appendix 2, or published candidate drivers of HDGC), in a CDH1 mutated background:

1. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 1
2. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 2
3. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 3
4. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 4
5. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 5
6. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 6
7. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 7
8. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 8
9. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 9
10. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 10
11. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 11
12. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 12
13. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 13
14. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 14
15. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 15
16. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 16
17. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 17
18. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 18
19. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 19
20. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 20
21. (Human or mouse) engineered gastric organoids of genotype 21

This results in a maximum of 225 animals per experiment. Since we will perform studies with both human and mouse targeted organoids, we will use 450 mice in these studies over 5 years.

The total number of mice requested for the subcutaneous section of this proposal is: 510.

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:

Cell culture experiments will be performed prior to beginning any in vivo work. The results of these experiments will be critically evaluated and in vivo tests will be undertaken only if the cell culture experiments are considered to be sufficiently promising. However, as cancer is a complex disease, and

we hope to translate our findings to the clinical setting, our experiments cannot be limited to results from cell culture alone. Organoids, cells, and computer models are not yet sophisticated enough to mimic factors such as the stroma, oxygen supply, the immune system, and metabolism, and therefore cannot yet replace in vivo tumor models.

Reduction:

The proposed number of animals per group (n=5-10 animals) is based on institute-wide experience with these types of experiments, as well as statistical calculations. Further reduction of the number of animals per cohort would decrease the statistical power of the experiments.

Refinement:

We have elected to perform this analysis in a subcutaneous, rather than an orthotopic model, since we expect the engineered organoid lines that we select for this experiment to be more malignant. The subcutaneous model will cause the least amount of discomfort to the mice since the tumors that form will be visible under the skin. Therefore, we can monitor tumor growth carefully, which would not be possible in an orthotopic model where the tumors form in an internal organ and may, for example, result in obstruction of the GI tract. Additionally, injections will be performed under once only once, under anaesthesia, and in an appropriate volume. Animals will be closely monitored during the immediate post injection period and tumor growth will be measured every week.

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

We realize that the procedures described in this appendix will inevitably cause stress and suffering to the animals. In order to minimize these effects, we will adhere to the general and internationally accepted rules (Code of Practice) of handling lab animals in oncology [Workman et. al., 2010]. Under these rules, the animals will be humanely killed when any humane endpoint is reached. Furthermore, mice are housed in state-of-the-art, individually ventilated cages. As standard procedure, mice in our facility are group-housed and provided with cage enrichment, bedding, and free access to food and water.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Within the NKI, we have developed a standard operation protocol that describes the most appropriate methods for anaesthesia and analgesia for each (surgical) procedure. This protocol has been developed by the animal welfare officer of the NKI and may be subject to change when new concepts or ideas about optimal anaesthesia/analgesia evolve. Based on the current protocol, the most appropriate anaesthetic for our application is isoflurane and analgesic is Rimadyl.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Similar to cancer patients, animals carrying tumors implanted subcutaneously may develop complications due to growth of the primary tumor or due to metastasis. Although all mice will be sacrificed as soon as a humane endpoint is reached, the mice may undergo mild to moderate discomfort due to tumor growth. Should any signs of discomfort be detected, the mouse will be observed daily and the decision to sacrifice the mouse will be made with the help of the NKI animal welfare officers. If a humane endpoint is reached, the mouse will be sacrificed immediately

Explain why these effects may emerge.

These effects are an unavoidable consequence of tumor growth.

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

In general, the effects on the wellbeing of the mice due to tumor growth cannot be completely avoided. In order to minimize the burden on the mice, they will be monitored for signs of distress (hunched back, lack of grooming, blood in feces, signs of infection, significant weight loss) and killed when any of the humane endpoints described below are met. Nevertheless, unforeseen complications may arise. In such cases, we will attempt to find solutions which minimize the impact of unforeseen complications, for example, by providing easy access to food (mush-feeding), taking into account the humane endpoints below.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

We will adhere to the Code of Practice of lab animals used in oncology, in line with internationally agreed rules (see P. Workman et al. Guidelines for welfare and use of animals in cancer research. Br J Cancer 2010; 102: 1555-1577). In general, the most important humane endpoints that apply are:

- Weight loss of more than 20% of the initial body weight, measured from the start of treatment of adult animals.
- Tumor mass greater than 10% of the body weight.
- Severe abnormal breathing.
- Severe abnormal behavior (for example: lack of grooming, hunched posture, pilo-erection).
- Subcutaneous tumor of greater than 1500mm³

Indicate the likely incidence.

For the subcutaneous model, we expect that only a subset of the mutations tested will lead to tumor formation. If we estimate that 50% of the mice will form tumors of various sizes, then it is possible that 50% of our mice may reach a tumor mass of >10% of the body weight or a tumor volume of 1500mm³.

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').

Our subcutaneous mouse model of human or mouse gastric cancer involves the subcutaneous injection of cells and the development of visible tumors under the skin. Therefore, those mice which develop tumors may experience mild to moderate discomfort due to subcutaneous tumor growth. Although it is not possible to know which organoid lines will form subcutaneous tumors without testing this directly, we estimate that 50% of the organoid lines that we test will be able to form subcutaneous tumors, which results in up to 50% of the mice in this appendix experiencing mild to moderate discomfort. The remaining 50% of the mice will experience mild discomfort due to the subcutaneous implantation procedure, which requires anaesthesia. To prevent unnecessary suffering, all mice will be sacrificed in the event that the tumor reaches 1500mm³.

Additional discomfort due to procedures:

Simple but frequent handlings, like weighing and tumor volume measurements: mild discomfort.

Therefore, we expect that mice under this appendix will experience mild, moderate, and severe discomfort in: 50, 50, and 0% of the cases, respectively.

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 do a full pathology exam on the tumors, and necropsy on the mice (to look for metastases), it is necessary to remove the affected organ(s). Therefore, the mice will need to be sacrificed at the end of the experiment.

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 aan CCD

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
 1. Titel van het project: Screening for drivers of gastric cancer
 2. Titel van de NTS: Screening voor drijvers van maagkanker
3. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
4. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC:
 - telefoonnummer contactpersoon:
 - e-mailadres contactpersoon:
5. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 04-10-2016
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 12-10-2016 en 10-01-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 19-10-2016 tot 02-01-2017 en 30-01-2017 tot 02-02-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 02-01-2017 en 02-02-2017
 - advies aan CCD: 20-02-2017
6. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
 - Datum:
 - Plaats:
 - Aantal aanwezige DEC-leden:
 - Aanwezige (namens) aanvrager:
 - Gestelde vraag / vragen:
 - Verstrekt(e) antwoord(en)

 - Vragen (datum: 19-10-2016) en antwoorden (datum: 02-01-2017):
 - 1.3.: de DEC acht de titel niet representatief voor de aanvraag. De organoids staan niet centraal in deze aanvraag. Die vormen niet meer dan een tool bij het zoeken naar genen die (als een soort second hit) betrokken zouden kunnen zijn bij HDGC. De DEC ziet de screen die zich richt op maagkanker als de kern van deze aanvraag. Dat zou ook in de titel tot uiting moeten komen.
 - *Aangepast.*

- 2.1.: de DEC denkt dat dit geen translationeel onderzoek is. “Translational or applied research” zou dan uitgevinkt moeten worden.
- *Aangepast.*
- 3.1.: de DEC heeft de onderzoeker gevraagd beter te onderbouwen waarom hij denkt dat één “extra hit” naast CDH1 voldoende is voor het ontstaan van maagkanker (HDGC).
- *De onderzoeker heeft dit nader toegelicht in het antwoord op vraag 3.1 en 3.4.1.*
- 3.1.: De DEC heeft haar zorgen geuit over de haalbaarheid van dit onderzoek. Welke aanwijzingen zijn er dat de screen in deze vorm werkt?
- *De onderzoeker heeft dit nader toegelicht in het antwoord op vraag 3.1.*
- 3.2.: De DEC zou graag zien dat de directe doelen meer worden benadrukt. Er ligt nu veel nadruk op “the overarching goal”.
- *De onderzoeker heeft de directe doelen opgenomen in de tekst van het antwoord op deze vraag.*
- 3.4.1.: De DEC is nog niet geheel overtuigd door uw argumenten voor de orthotope benadering om de resultaten van de screen te valideren.
- *De onderzoeker heeft aanvullende argumenten opgenomen in de tekst van het antwoord op vraag 3.4.1.*
- 3.4.: de DEC verzoekt de onderzoeker het doel van het gebruik van de methode met de magneet te verduidelijken.
- *De onderzoeker heeft een toelichting toegevoegd.*
- 3.4.: de DEC verzoekt de onderzoeker een duidelijk stappenplan dan wel schema op te nemen, zodat de volgorde van de experimenten inzichtelijker wordt.
- *De onderzoeker heeft een flowchart toegevoegd.*
- **Appendix 1:**
- De DEC heeft de onderzoeker tal van redactionele en praktische suggesties aan de hand gedaan.
- *De onderzoeker heeft veel van die suggesties gevolgd.*
- 2B (dieren): de DEC verzoekt de onderzoeker aan te geven of mannetjes en vrouwtjes in evenredige aantallen zullen worden gebruikt. Indien dat niet zo is, wat zijn dan de redenen daarvoor? Kunt u ook aangeven om welke stam(men) het gaat en of het klopt dat dit commerciële dieren zullen zijn?
- *de onderzoeker heeft in de aanvraag tekst opgenomen over het geslacht van de te gebruiken dieren en over de te gebruiken stammen en hun herkomst.*
- 2B: (in vivo screen training): de DEC acht de aantallen dieren aangevraagd voor de training uit balans met het totale aantal en vraagt de onderzoeker of het zou volstaan om 2 à 3 personen te trainen.
- *Het aantal te trainen personen is teruggebracht naar maximaal 4.*
- 2B: (in vivo screen experimental set-up): de DEC verzoekt de onderzoeker te heroverwegen of de eerste 6 groepen met buffer noodzakelijk zijn en of eventueel kan worden volstaan met het laatste tijdstip.

- *De onderzoeker heeft uitgelegd dat dit in principe kan, maar dat het er toe zou leiden dat interessante tussentijdse resultaten pas na lange tijd (zelfs tot een jaar) vergeleken kunnen worden met de negatieve controlegroep, omdat die ene negatieve controlegroep tot het eind in de proef moet blijven. Dit is ongewenst.*
- D: de DEC verzoekt de onderzoeker het in vitro voorwerk duidelijker te beschrijven.
- *Aangepast.*
- **Appendix 2**
- De DEC heeft de onderzoeker tal van redactionele en praktische suggesties aan de hand gedaan.
- *De onderzoeker heeft veel van die suggesties gevolgd.*
- Algemeen: wijzigingen in de voorgaande bijlage die ook van toepassing zijn in bijlage 2, dienen ook hier te worden doorgevoerd.
- 2B (dieren): de DEC verzoekt de onderzoeker aan te geven of mannetjes en vrouwtjes in evenredige aantallen zullen worden gebruikt. Indien dat niet zo is, wat zijn dan de redenen daarvoor? Kunt u ook aangeven om welke stam(men) het gaat en of het klopt dat dit commerciële dieren zullen zijn?
- *de onderzoeker heeft in de aanvraag tekst opgenomen over het geslacht van de te gebruiken dieren en over de te gebruiken stammen en hun herkomst.*
- B: (orthotopic model training): de DEC vraagt de onderzoeker of het volstaat om minder personen te trainen.
- *Het aantal te trainen personen is teruggebracht naar maximaal 5.*
- Appendix 3:
- De DEC heeft de onderzoeker tal van redactionele en praktische suggesties aan de hand gedaan.
- *De onderzoeker heeft veel van die suggesties gevolgd.*
- Algemeen: wijzigingen in voorgaande bijlagen die ook van toepassing zijn in bijlage 3, dienen ook hier te worden doorgevoerd.
- B (dieren): de DEC verzoekt de onderzoeker aan te geven of mannetjes en vrouwtjes in evenredige aantallen zullen worden gebruikt. Indien dat niet zo is, wat zijn dan de redenen daarvoor? Kunt u ook aangeven om welke stam(men) het gaat en of het klopt dat dit commerciële dieren zullen zijn?
- *de onderzoeker heeft in de aanvraag tekst opgenomen over het geslacht van de te gebruiken dieren en over de te gebruiken stammen en hun herkomst.*
- NTS:
- In het algemeen lijkt het de DEC een te lange en te ingewikkelde NTS, waarbij het taalgebruik beter zou kunnen worden afgestemd op de doelgroep.
- algemeen: wijzigingen in het project naar aanleiding van vragen van de DEC, dienen ook te worden doorgevoerd in de NTS.
- *De onderzoeker heeft de NTS aangepast.*
- 2^e ronde vragen (datum: 30-01-2017) en antwoorden (datum: 02-02-2017)

- de DEC heeft de antwoorden van de eerste ronde en de bijgestelde versies van de projectaanvraag, bijlagen en NTS besproken en in reactie daarop de aanvrager nog een aantal redactionele en praktische suggesties aan de hand gedaan. Dit betrof niet opgevolgde redactionele suggesties uit de eerste ronde en het beantwoorden van vraag 2E in de bijlagen met “niet van toepassing”.
- *Alle suggesties zijn door de aanvrager verwerkt.*

8. 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. Geen van de DEC-leden is betrokken bij deze projectaanvraag.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking ‘Invulling definitie project’ van de CCD. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan.
In dit project zal om te beginnen een genetische screen bij muizen uitgevoerd worden om genen te vinden die in combinatie met het gen CDH1 betrokken zijn bij het ontstaan van een erfelijke vorm van maagkanker (Erfelijke Diffuse Maagkanker: HDGC). De hypothese is dat een mutatie in een ander relevant gen (een second hit naast CDH1), de kans op het ontstaan van maagkanker aanzienlijk vergroot en mede bepaalt hoe agressief de tumor zal zijn. De kandidaatgenen die uit de screening naar voren komen zullen in een orthotoop model (dus in de maag) bij muizen worden gevalideerd. Na die validatie worden in een subcutaan muismodel de invasieve eigenschappen van de verschillende tumoren onderzocht. Dit alles moet uiteindelijk bijdragen aan het ontwikkelen van een test waarmee deze erfelijke vorm van maagkanker vroegtijdig kan worden opgespoord bij mensen waarvan bekend is dat ze een CDH1 mutatie hebben. Het ontwerpen en valideren van de test maakt geen deel uit van deze projectaanvraag. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en dat er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.
2. Voor zover de DEC weet is er geen tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het vinden van genen die samen met CDH1 betrokken zijn bij het ontstaan en verloop van een erfelijke vorm van maagkanker. De hypothese is dat een mutatie in een ander relevant gen (een second hit naast CDH1), nodig is om maagkanker te laten ontstaan en mede bepaalt hoe agressief de tumor zal zijn. De daadwerkelijke invloed van de in de screening gevonden genen op het ontstaan van kanker en op de eigenschappen van de tumor zal worden gevalideerd en nader onderzocht. Het uiteindelijke doel is om langs deze weg informatie te krijgen die behulpzaam kan zijn bij het opzetten van een test voor erfelijke maagkanker bij mensen waarvan bekend is dat ze een CDH1 mutatie hebben. Het opzetten en valideren van die test maakt geen deel uit van dit project. Het verband tussen het directe doel en het uiteindelijke doel is dus niet direct aanwezig binnen dit project, het betreft immers fundamenteel onderzoek, maar wel reëel. Het doel van deze projectaanvraag is gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

Voor de onderzoekers geldt dat ze belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten kunnen publiceren, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en -mogelijkheden. Naar de mening van de DEC dient dat geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren, maar is het ook niet bezwaarlijk als nieuwsgierigheid en ambitie belangrijke drijfveren zijn voor onderzoekers. Voor de rechtvaardiging van dit onderzoek gaat het uiteindelijk echter om de vraag of het belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

Dit onderzoek is in de eerste plaats fundamenteel van aard en levert informatie en kennis op die van belang is voor de voortgang van het onderzoek in dit veld. Voor de dragers van een CDH1 mutatie is dit onderzoek van belang, omdat het op termijn kan bijdragen aan een verbetering van de mogelijkheden om de kans op een agressieve vorm van erfelijke maagkanker te voorspellen en de maagkanker in een vroeg stadium op te sporen en te behandelen, waardoor de patiënt uitzicht heeft op genezing of een langere overlevingstijd met een beter kwaliteit van leven. Het probleem is op dit moment namelijk dat deze vorm van maagkanker vaak pas in een laat stadium ontdekt wordt, waardoor de tumor al niet meer te behandelen is.
6. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Intrinsiek is dit project naar de mening van de DEC wel vrij risicovol, in die zin dat al vroeg in het project zou kunnen blijken dat de gekozen benadering niet werkt, maar dat is te rechtvaardigen gezien het belang van het potentieel hiermee te verkrijgen inzicht. Bovendien is op de juiste punten in het project een go/no go moment ingebouwd, zodat het project tijdig kan worden gestopt. De onderzoeker heeft na vragen daarover van de DEC zijn aanpak nader toegelicht. De DEC acht de wetenschappelijk

keuzes die de aanvrager maakt verdedigbaar. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is **geen** sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)
10. De huisvesting en verzorging van de dieren vinden plaats conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor het grootste deel van de dieren (94%) is het ongerief maximaal matig. Dit ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door (chirurgische) ingrepen onder anesthesie die tot doel hebben tumoren te induceren. Tumorgroei en metastasering zullen in dit project niet leiden tot ernstig ongerief, omdat het voor de doelstelling niet nodig is tumoren lang en tot grote omvang te laten groeien. Er worden strikte humane eindpunten gehanteerd, maar de verwachting is dat slechts een klein deel van de dieren (bijlage 3: subcutane tumoren) een humaan eindpunt zal bereiken, omdat de omvang van de tumor anders te groot zou worden. Op dat moment is echter van ernstig ongerief nog geen sprake. Bij de overige dieren (6%) zal het ongerief licht zijn, omdat de subcutane tumor niet aanslaat of slechts zeer beperkt groeit en de handelingen om de subcutane tumor te induceren niet meer dan licht ongerief veroorzaken. Het cumulatief ongerief voor de dieren is dus juist ingeschat als matig voor 94% van de dieren, en licht voor 6% van de dieren.
12. Elke dierproef brengt instrumenteel gebruik van speciaal voor dat doel in gevangenschap gefokte dieren met zich mee, hetgeen op zich al opgevat kan worden als een aantasting van hun integriteit. Omdat dit voor elk project geldt, vermeldt de DEC hier alleen zaken die kenmerkend zijn voor dit specifieke project. De integriteit van de dieren wordt aangetast door het induceren van orthotope en subcutane tumoren. Dit leidt in de eerste plaats tot een matige aantasting van het welzijn, maar het valt niet uit te sluiten dat dit ook invloed heeft op het gedrag en zelfredzaamheid van de dieren. Naar het oordeel van de DEC liggen de gehanteerde humane eindpunten ruim voor het moment waarop dergelijke aantastingen van de integriteit problematische vormen aannemen. De commissie is daarom van mening dat er sprake is van een lichte aantasting van de integriteit.
13. Normaal gesproken valt in het grootste deel van dit onderzoek niet te verwachten dat dieren een humaan eindpunt zullen bereiken, omdat de tumorontwikkeling veel ongerief veroorzaakt. Dit is op basis van eerdere ervaringen en gegevens in de literatuur ingeschat. In bijlage 3 zal naar schatting de helft van de dieren waarbij de subcutane tumor aanslaat, een humaan eindpunt bereiken, omdat de tumor de vooraf bepaalde maximale omvang van 1500mm³ overschrijdt. Op dat moment is van ernstig ongerief echter nog geen sprake. De criteria voor humane eindpunten

zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op de experimenten. De commissie is het eens met de inschattingen en met de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De genetische screening vindt plaats met genen die geselecteerd zijn door onderzoek bij maagkankerpatiënten met een CDH1 mutatie. De orthotope validatie en het subcutane onderzoek zijn noodzakelijk. De complexe interactie tussen de tumor en het immuunsysteem en tussen de tumor en het omliggende weefsel zijn niet *in vitro* na te bootsen. Het is niet mogelijk om de vraagstellingen van dit project volledig zonder proefdieren te beantwoorden.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De gehanteerde screeningstechniek (met een lentivirale gRNA library) maakt het mogelijk om bijna duizend genen tegelijk te testen met een naar verhouding klein aantal dieren. Voor de volgende stap wordt een selectie gemaakt van een veel kleiner aantal genen waarmee vervolgens verder onderzoek wordt gedaan. De onderzoekers hanteren ook in de rest van het onderzoek een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijk aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De dieren worden niet langer dan noodzakelijk in het experiment gehouden en er worden adequate humane eindpunten gehanteerd. Daarbij wordt de "Code of Practice" voor het kankeronderzoek gevolgd. Voor de inductie van de orthotope tumoren worden verfijnde, niet chirurgische methoden benut. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het project betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project gebruik maken van zowel mannelijke, als vrouwelijke dieren in gelijke hoeveelheden.
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om weefsels en organen na afloop te kunnen uitnemen voor verder onderzoek en om te voorkomen dat de zich verder ontwikkelende tumor ongerief zal gaan veroorzaken. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gedood om niet-wetenschappelijke redenen.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?

2. Voor alle dieren vindt een lichte of matige aantasting van welzijn en integriteit plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.

Doel van het project is het vinden van genen die samen met CDH1 betrokken zijn bij het ontstaan en verloop van een erfelijke vorm van maagkanker. De hypothese is dat een mutatie in een ander relevant gen (een second hit naast CDH1), nodig is om maagkanker te laten ontstaan en mede bepaalt hoe agressief de tumor zal zijn. De daadwerkelijke invloed van de in de screening gevonden genen op het ontstaan van kanker en op de eigenschappen van de tumor zal worden gevalideerd en nader onderzocht. Het uiteindelijke doel is om langs deze weg informatie te krijgen die behulpzaam kan zijn bij het opzetten van een test voor erfelijke maagkanker bij mensen waarvan bekend is dat ze een CDH1 mutatie hebben. Bij mensen met een mutatie in dit gen wordt op dit moment vaak pas in een relatief laat stadium vastgesteld dat ze maagkanker hebben, waardoor de tumor al niet meer behandeld kan worden. Een verbetering van de mogelijkheden om de kans op een agressieve vorm van erfelijke maagkanker te voorspellen en de maagkanker in een vroeg stadium op te sporen en te behandelen, waardoor de patiënt uitzicht heeft op genezing of een langere overlevingstijd met een beter kwaliteit van leven, acht de DEC van groot belang.

3. De DEC is overtuigd van het grote belang van de doelstelling van dit project. De commissie is daarnaast overtuigd van de kwaliteit van het onderzoek van de aanvrager. Dit onderzoek is ingebed in een gerenommeerd instituut dat over alle noodzakelijke voorzieningen beschikt. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

- Op grond van het wettelijk vereiste (art. 10a1, lid 3) dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

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

- De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
 3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]

[Redacted contact information]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Nederlands Kanker Instituut

[Redacted]

Postbus 90203

1066 CX AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD301002017876

Bijlagen

2

Datum 21 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 20 februari 2017. Het gaat om uw project "Screening for drivers of gastric cancer". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD301002017876. 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:

21 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD301002017876

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
21 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD301002017876

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 maart 2017
Geplande einddatum: 1 maart 2022
Titel project: Screening for drivers of gastric cancer
Titel niet-technische samenvatting: Screening voor bestuurders van menselijke kanker
Naam DEC: NKI
Postadres DEC: t.a.v. [REDACTED]; Postbus 90203; 1006 BE Amsterdam
E-mailadres DEC: [REDACTED]

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:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Amsterdam

Datum:

20 februari 2017

Datum:

21 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD301002017876



10.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Nederlands Kanker Instituut

Postbus 90203

1066 CX AMSTERDAM



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD301002017876

Bijlagen

1

13 MRT 2017

Datum 10 maart 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 20 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Screening for drivers of gastric cancer" met aanvraagnummer AVD301002017876. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

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

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

U kunt met uw project "Screening for drivers of gastric cancer" starten. De vergunning wordt afgegeven van 14 maart 2017 tot en met 1 maart 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie NKI gevoegd. Dit advies is opgesteld op 20 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.

Datum:
10 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD301002017876

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: Nederlands Kanker Instituut

Adres: Postbus 90203

Postcode en plaats: 1066 CX AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 30100

deze projectvergunning voor het tijdvak 14 maart 2017 tot en met 1 maart 2022, voor het project "Screening for drivers of gastric cancer" met aanvraagnummer AVD301002017876, volgens advies van Dierexperimentencommissie NKI. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]. Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 20 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per brief op 10 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 20 februari 2017, ontvangen op 20 februari 2017.

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|-------------------------------------------------------------|-------------------------|---------------|------------------------------|-------------|
| 3.4.4.1 In vivo screen for drivers of gastric cancer | | | | |
| | Muizen (Mus musculus) / | 580 | 100% Matig | |
| 3.4.4.2 Orthotopic models of gastric cancer | | | | |
| | Muizen (Mus musculus) / | 2.994 | 100% Matig | |
| 3.4.4.3 Subcutaneous models of gastric cancer | | | | |
| | Muizen (Mus musculus) / | 510 | 50% Matig 50% Licht | |

Aanvraagnummer:

AVD301002017876

Voorwaarden

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

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

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



Aanvraagnummer:
AVD301002017876

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:

AVD301002017876

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 2017879 | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 | |
| 1 | Origineel aanvraagformulier | | | | x | | x | x | | |
| 2 | NTS oud | | | x | | | | | | |
| 3 | Projectvoorstel | | | x | | | | | | |
| 4 | Bijlage | | | x | | | | | | |
| 5 | Ontvangstbevestiging en factuur | | | | x | | x | x | | |
| 6 | Verzoek om aanvullende informatie | | | | x | | x | x | | |
| 7 | Bijlage aangepast | | | x | | | | | | |
| 8 | NTS nieuw | x | | | | | | | | |
| 9 | DEC advies | | | | x | | x | x | | |
| 10 | Advies CCD | | x | | | | | | x | |
| 11 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | | |

AVD 1.08002017839



1.

20 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 10800 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt. | Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED] KvK-nummer: 30275924 |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | Straat en huisnummer: Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht Postbus: 12007 Postcode en plaats: 3501AA Utrecht IBAN: NL27INGB0000425267 Tenaamstelling van het rekeningnummer: Universiteit Utrecht |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker. | (Titel) Naam en voorletters: [REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" 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: Post-doc onderzoeker Afdeling: [REDACTED] Telefoonnummer: [REDACTED] E-mailadres: [REDACTED] |

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 01 - 4 - 2017
- Einddatum 1 - 10 - 2018
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Tumorigenicity and oncogenicity in vivo of ciPTEC OAT1 kidney cells
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Kanker bevorderende en tumorvormende eigenschappen van genetisch aangepaste niercellen
- 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 € 1.035 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

[Redacted signature area]

Utrecht

16-02-2017

[Redacted signature area]



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 | Kanker bevorderende en tumorvormende eigenschappen van genetisch aangepaste niercellen |
| 1.2 Looptijd van het project | 1,5 jaar |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Tumor - niercel - kanker - biologische kunstnier - veiligheidsstudie |

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | Er is een grote behoefte aan een biologische-kunstnier. Mensen met een ernstige ziekte waarbij de nier faalt, zijn op dit moment afhankelijk van twee behandelmethoden; niertransplantatie of nierdialyse. Een niertransplantatie is de beste behandeling, maar de gemiddelde wachttijd voor een nier is lang, ruim 3 jaar, en de kwaliteit van leven is slecht waardoor sommige patiënten niet op tijd kunnen worden geholpen. Na transplantatie zal de patient bovendien medicijnen moeten slikken om de kans op afstoting van het donororgaan te beperken, wat veel bijwerkingen met zich mee brengt. De meeste patiënten ondergaan nierdialyse, een behandelmethode dat ongeveer 20% van de schadelijke stoffen uit het lichaam kan halen, maar 80% dus niet waardoor deze stoffen zich in het lichaam ophopen en verantwoordelijk zijn voor heftige bijwerkingen, zoals vermoeidheid en een groot risico op hart- en vaatziekten. Veel patiënten zeggen 'dialyseren is geen leven maar |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

overleven'.

Een mogelijke uitkomst is de biologische-kunstnier. Dit is een kunstnier die van binnen bekleed is met menselijke niercellen die ervoor zorgen dat de overgebleven afvalstoffen ook verwijderd kunnen worden. Deze cellen zijn genetisch aangepast zodat ze in het laboratorium op grote schaal gekweekt kunnen worden waarna ze in de kunstnier gebracht worden. Deze kunstnier wordt net als dialyse buiten het lichaam aangesloten op de bloedbaan. We verwachten dat een afweerreactie niet zal plaatsvinden, dus ook het gebruik van extra medicijnen tegen afstoting zal niet nodig zijn.

In dit project wordt de veiligheid van deze genetisch aangepaste menselijke niercellen onderzocht wanneer zij in een levend organisme terecht komen. Onderzocht wordt of deze cellen direct tumoren kunnen vormen, en of de inhoud van deze cellen op een indirecte manier kankerbevorderende eigenschappen heeft. Het betreft dus een veiligheidsstudie.

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

De opbrengst is dat we een uitspraak kunnen doen over de veiligheid van deze niercellen in de biologische-kunstnier. Een antwoord op de vraag: brengt het in contact komen met deze cellen een hoger risico op kanker met zich mee, of niet?, is voor vervolgonderzoek essentieel. Als de biologische-kunstnier werkt en vooral veilig is, kunnen veel nierpatienten behandeld worden en wordt de kwaliteit van leven van deze patienten bovendien sterk verbeterd.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

In dit project worden maximaal 80 ratten gebruikt.

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

In sommige dieren kunnen tumoren ontstaan en kan zich kanker ontwikkelen. In deze dieren kan het ongerief bestaan uit ongemak door localisatie van de tumor, angst, algehele malaise en mogelijk pijn, ontsteking, diarree/verstopping of uitvalsverschijnselen. Dit zal maximaal tot matig ongerief worden beperkt.

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

Dit project bestaat uit 1 experiment dat tweemaal onafhankelijk wordt uitgevoerd met daarin vier verschillende behandelgroepen.

De eerste behandelgroep is de positieve controlegroep. Deze groep wordt behandeld met cellen waarvan bekend is dat zij tumoren veroorzaken. Het ongerief voor deze groep wordt daarom ingeschat als ernstig.

De tweede behandelgroep is de negatieve controle. Deze groep wordt alleen behandeld met een zoutoplossing. In deze groep verwachten wij geen ongerief.

De derde behandelgroep wordt behandeld met onze niercellen. We delen deze groep in in de categorie ernstig ongerief omdat er een kans is dat deze cellen tumoren kunnen vormen.

De vierde behandelgroep wordt behandeld met de celinhoud van onze niercellen. Het kan zijn dat niet de cellen zelf, maar deeltjes die door de cellen worden geproduceerd aanleiding geven tot tumoren of kanker. Ook deze behandelgroep wordt in de categorie ernstig ongerief ingedeeld.

Samengevat, is er sprake van 25% licht ongerief en mogelijk 75% ernstig ongerief.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren worden na afloop geëuthanaseerd om de dieren te kunnen onderzoeken op aanwezigheid van tumoren of kankercellen. Hiervoor zullen

4 Drie V's

4.1 **Vervanging**

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

Er heeft al een groot aantal proefdiervrije onderzoeken naar deze cellen plaatsgevonden in het laboratorium. We hebben aan kunnen tonen dat de cellen geen afweerreactie veroorzaken. Daarnaast hebben we uitvoerig de verplaatsing van cellen bestudeerd. Echter, dit geeft een beeld van het "gedrag" van de cellen zelf, maar deze testen laten niet zien hoe de cellen reageren op een levend organisme, of omgekeerd hoe het organisme reageert op de cellen. Volgens veiligheidsvoorschriften is onderzoek in levende proefdieren vereist voordat we een volgende stap in de biologische kunstnier ontwikkeling kunnen maken. Hiervoor verwijzen wij naar het document "WHO Expert Committee on Biological Standardization", Sixty-first report.

4.2 **Vermindering**

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

Volgens veiligheidsvoorschriften wordt een aantal dieren per behandelgroep aangegeven, namelijk 10 dieren, en wij zullen dit aantal aanhouden.

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.

We gebruiken speciale ratten die bij uitstek geschikt zijn voor kanker- en transplantatieonderzoek. Deze dieren hebben een sterk verminderde afweer waardoor zij vatbaarder zijn voor het ontwikkelen van kanker of tumoren.

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

Dieren worden dagelijks gecontroleerd op welzijn door gecertificeerd personeel. Alle handelingen worden zo kort en efficiënt mogelijk uitgevoerd en alleen door bevoegd en bekwaam personeel om het ongerief bij de dieren zo veel mogelijk te beperken.

Huisvesting zal zodanig plaatsvinden dat de kans op infecties wordt geminimaliseerd.

De dieren zullen vanwege de aard van het project zeer frequent bekeken en gewogen worden. Tevens zullen de dieren worden gedood indien ze specifieke klinische symptomen gerelateerd aan de tumorvorming vertonen.

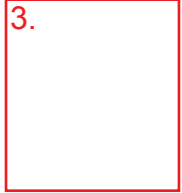
De eindpunten zullen aangehouden worden zoals deze vermeld staan in het "Code of practice: proefdieren in kankeronderzoek".

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 number of patients with chronic kidney disease (CKD) and end stage renal disease (ESRD) is continuously growing. Currently, more than 2 million people are suffering from ESRD worldwide, and the number is still increasing [1]. The major problem in CKD patients, other than kidney function loss, is the

presence of several comorbidities, such as cardiovascular disease, that develop as a result of accumulation of uremic waste metabolites, thus increasing mortality in this patient population [2-4]. Currently available treatments for CKD and ESRD are hemodialysis, peritoneal dialysis and kidney transplantation, with transplantation being the preferred one due to its ability to restore kidney function. Because of the shortage in kidney donors, for most of the patients this treatment is not available, which makes (hemo- or peritoneal) dialysis the only available treatment. However, dialysis is not very efficient in removing the uremic wastes, maintaining most of the mortality-associated comorbidities [5]. For that reason, innovative therapies for CKD are being developed, and one of the most promising solutions is the bioartificial kidney (BAK) device, composed of proximal tubule epithelial cells (PTEC) cultured on hollow fiber membranes (HFM) with generation of confluent and fully differentiated epithelial cell monolayers [6]. Such a (extracorporeal) device will be able to improve the removal of uremic waste compounds from blood of affected patients, by incorporating the physiological functions of the renal tubules such as excretion (Figure 1).

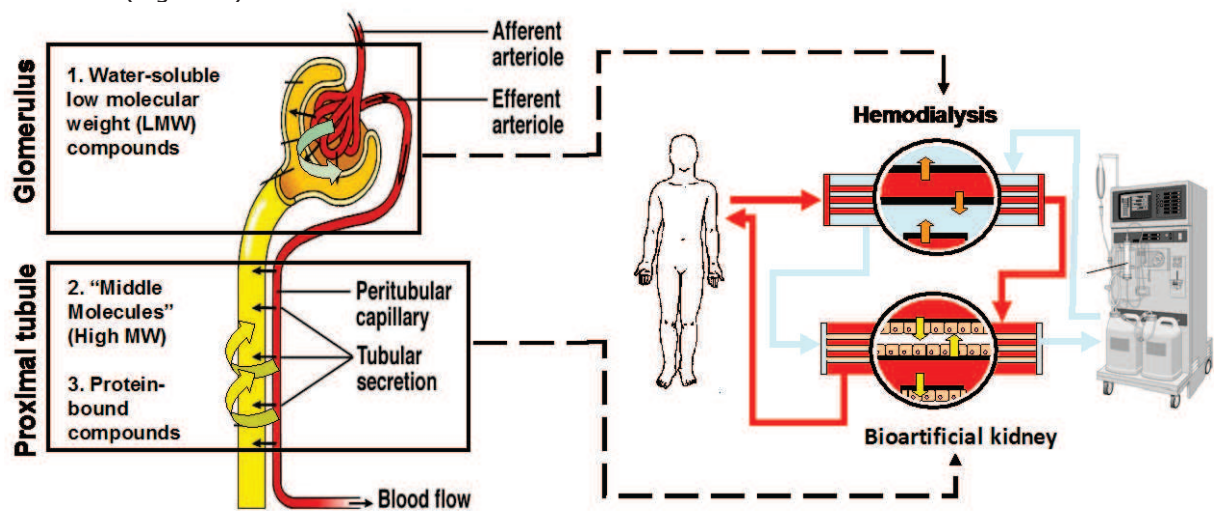


Figure 1. Combination of hemodialysis (mimicking glomerular function) and of the bioartificial kidney (BAK; mimicking tubular function) for achieving a complete removal of uremic solutes from blood.

For the purpose of BAK development we intend to use conditionally immortalized proximal tubule epithelial cell lines (ciPTEC), derived from urine of healthy donors [7, 8]. Although the use of patient's own kidney cells would be preferred, this is, as of yet, not possible. The ciPTEC were obtained through immortalization by retroviral transduction with temperature-sensitive mutant U19tsA58 of SV40 large T antigen (SV40T) and the essential catalytic subunit of human telomerase (hTERT), as described [9-11], which allows them to proliferate at the permissive temperature of 33°C and to differentiate to mature PTEC at non-permissive temperature of 37°C. In addition, a lentiviral transduction was performed in ciPTEC in order to overexpress the organic anion transporter 1 (OAT1;SLC22A6), involved in active tubular uptake of organic anions in humans [12], among which the protein-bound anionic uremic toxins [13]. ciPTEC were extensively characterized for many proximal tubule functions, such as transport activities, and were successfully cultured on HFM for BAK development [7, 12, 13]. Moreover, our recent data demonstrate that ciPTEC are not immunogenic and, therefore, represent a safe choice for BAK application because immunosuppressive agents may not be needed with its application.

However, given that the cell immortalization is one of the key steps during the process of transformation and tumorigenesis, there is an important concern regarding the safety aspects of using immortalized cells with retroviral delivery and ectopic expression of different oncogenes, such as SV40T, for cell therapy and tissue engineering applications. One of the major risks associated with the use of retro- and lentiviruses is the potential for tumorigenesis and oncogenesis, which can depend on the nature of the vector system, as well as the transgene itself. In the case of immortalization by SV40T there are two main mechanisms of action: 1) activation of E2F-mediated transcription and (2) inhibition of p53. The overall effect of this SV40T mechanism of action is excessive cellular proliferation by overcoming growth arrest and preventing apoptosis [14]. However, the fact that SV40T used for the immortalization of

ciPTEC is temperature-sensitive mutant can make it a safer option for cell therapy applications. In fact, our current studies *in vitro* show that the SV40T expression at 37°C is completely absent in ciPTEC, and the proliferation of cells cultured at non-permissive temperature is significantly reduced, which indicates that the expression of SV40T is highly controlled. In addition, the hTERT, also used for cell immortalization, is responsible for elongation of telomeres by adding TTAGGG sequences to the end of existing chromosomes, thus allowing cells to avoid senescence and continue to grow and divide, without inducing cell transformation [15].

Moreover, the genome integrational site analyses that we performed showed that the integration of the transgenes (SV40T, hTERT and OAT1), even though being random, is stable and not involving any genes responsible for cell growth and proliferation, further confirming that genetically modified ciPTEC do not show any, potentially dangerous, genomic alterations.

As stated by World Health Organization (WHO), *in vitro* systems are not always sufficient to prove the lack of tumorigenic effect of a cell line intended for cell therapy applications. Therefore, the capacity to form tumors needs to be tested in immunosuppressed animals. In addition, the oncogenic potential of cell substrates, such as DNA or cell lysate, or the oncogenic activity of viral agents that might be present in the cells, are other fundamental questions that have to be addressed using immunodeficient animal models [16].

1. Neiryneck, N., et al., *An update on uremic toxins*. Int Urol Nephrol, 2013. **45**(1): p. 139-50.
2. Ortiz, A., et al., *Epidemiology, contributors to, and clinical trials of mortality risk in chronic kidney failure*. Lancet, 2014. **383**(9931): p. 1831-43.
3. Vanholder, R., et al., *A bench to bedside view of uremic toxins*. J Am Soc Nephrol, 2008. **19**(5): p. 863-70.
4. Go, A.S., et al., *Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization*. N Engl J Med, 2004. **351**(13): p. 1296-305.
5. Deltombe, O., et al., *Exploring Protein Binding of Uremic Toxins in Patients with Different Stages of Chronic Kidney Disease and during Hemodialysis*. Toxins (Basel), 2015. **7**(10): p. 3933-46.
6. Jansen, J., et al., *Biotechnological challenges of bioartificial kidney engineering*. Biotechnol Adv, 2014. **32**(7): p. 1317-27.
7. Wilmer, M.J., et al., *Novel conditionally immortalized human proximal tubule cell line expressing functional influx and efflux transporters*. Cell Tissue Res, 2010. **339**(2): p. 449-57.
8. Jansen, J., et al., *A morphological and functional comparison of proximal tubule cell lines established from human urine and kidney tissue*. Exp Cell Res, 2014. **323**(1): p. 87-99.
9. O'Hare, M.J., et al., *Conditional immortalization of freshly isolated human mammary fibroblasts and endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(2): p. 646-51.
10. Saleem, M.A., et al., *A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression*. J Am Soc Nephrol, 2002. **13**(3): p. 630-8.
11. Satchell, S.C., et al., *Conditionally immortalized human glomerular endothelial cells expressing fenestrations in response to VEGF*. Kidney Int, 2006. **69**(9): p. 1633-40.
12. Nieskens, T.T., et al., *A Human Renal Proximal Tubule Cell Line with Stable Organic Anion Transporter 1 and 3 Expression Predictive for Antiviral-Induced Toxicity*. AAPS J, 2016. **18**(2): p. 465-75.
13. Jansen, J., et al., *Bioengineered kidney tubules efficiently excrete uremic toxins*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 26715.
14. Ahuja, D., M.T. Saenz-Robles, and J.M. Pipas, *SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation*. Oncogene, 2005. **24**(52): p. 7729-45.
15. Jiang, X.R., et al., *Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype*. Nat Genet, 1999. **21**(1): p. 111-4.
16. *WHO Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks*. Geneva, World Health Organization (WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-first report; WHO Technical Report Series, No. 978, Annex 3), 2010.

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 is to study the safety of ciPTEC OAT1 kidney cells in vivo. Hereby we investigate both the tumorigenicity and the oncogenicity of these specific kidney cells.

Tumorigenicity:

Tumorigenicity is defined as the property of cells to form tumors when inoculated into susceptible animals. As such, tumors that arise contain cells derived from the inoculated cells. This can occur at the site of injection but also elsewhere due to metastasis.

Oncogenicity:

Oncogenicity is defined as the property of an acellular agent to induce cells of an animal to become tumor cells. Tumors that arise are derived from the host itself. Oncogenic activity from cell substrates could be due to either the cell substrate DNA (and perhaps other cellular components) or an oncogenic viral agent present in the cells.

Procedure:

Tumorcells will be implanted in the flank, after which animals will be observed for developing tumors. In case of developing tumors, tumorsize will be measured using a digital or vernier caliper.

Translation:

As soon as any risk on tumorigenicity or oncogenicity results from the animal study, further development of the BAK system in its current form will be terminated. It is not known how humans respond to conditionally immortalized cell systems. Therefore, translation of negative results (i.e. no risk) to human is hampered. However, the choice of an immunodeficient animal model increases the reliability of such a translation.

Achievability:

We are convinced that our aim will be achieved within this project and we can decide whether or not ciPTEC-OAT1 kidney cells are tumorigenic/oncogenic.

The aim is achievable, since:

- Most importantly, we use a well established animal model in oncology, namely the T-cell deficient nude RNU rat. This is a susceptible rat in which cancerous cells are most likely to arise.
- We monitor the live animals for a long period of time after inoculation
- Tumors can easily be localized (by palpation) and measured (and be compared to our positive controls)
- Tissue can be examined both histologically and genotypically afterwards

3.3 Relevance

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

There is a great need of a BAK. People with a serious health condition or disease in which their kidneys fail, currently depend on kidney transplantation or kidney dialysis as possible treatments. However, both treatments are far from ideal. Patients undergoing dialysis have a poor quality of life and a lot of patients awaiting transplantation cannot be helped in time due to donor shortage. Moreover, even after successful transplantation there is still a chance of rejection of the donor kidney, for which patients need to take immunosuppressive medication with many side effects.

Kidney dialysis is a treatment that will remove certain toxic waste products (20%) from the body. However, other toxic waste products (80%) unfortunately cannot be removed and will accumulate in the body over time. This is due to limitations of the currently applied filter membranes within the artificial kidney.

A possible solution for these problems is the BAK. This is an artificial kidney that contains allogeneic

human kidney cells, such as our ciPTEC-OAT1 derived from a healthy donor. Those cells will remove the remaining toxic waste products that cannot be removed by the regular dialysis process. Great progress is currently being made in this field of research with promising results. These ciPTEC OAT1 cells are genetically modified so that they can be cultured on a large scale. Because of this modification an increased risk for tumorigenic or oncogenic properties exists.

In this project, we will investigate the safety of those genetically modified human kidney cells after inoculation in a living organism. We will investigate whether these cells can directly form tumors or metastases, and we will investigate whether the content of these cells has cancer promoting properties in an indirect manner.

When proven safe, these cells can be used for further development of the BAK. And once the BAK has been validated and made operational it will help and save millions of lives all over the world.

3.4 Research strategy

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

This project is a straightforward project with only one “type of animal procedure”, which contains a single experiment with four treatment groups. One positive control group, one negative control group, one tumorigenicity group and one oncogenicity group. Ten animals per treatment group will be inoculated and followed for a period of minimal 4 months and a maximum of 6 months. During this period we will measure tumorsize twice a week and perform clinical observation three times a week. At the end of the experiment, all animals will be euthanized and examined for gross and microscopic evidence of the growth of inoculated cells at the site of injection and in other sites. Also, all animals will be imaged at two timepoints for further evidence of growing cells in other sites.

Minimal observation period (4 months):

This minimal required observation period is stated in the WHO report: WHO Recommendations for the evaluation of animal cell cultures as substrates for the manufacture of biological medicinal products and for the characterization of cell banks. Geneva, World Health Organization (WHO Expert Committee on Biological Standardization. Sixty-first report; WHO Technical Report Series, No. 978, Annex 3), 2010; p138.

Maximal observation period (6 months):

This maximal observation period was previously used in a study by Liu et al. 2010. We want to use the same observation period. **Liu J, Mani S, Schwartz R, Richman L, Tabor DE. Vaccine. 2010 Feb 3;28(5):1285-93. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.11.023.** Liu also studied the oncogenicity and tumorigenicity of kidney cells (the canine MDCK cell line). This study was done to ensure the safety of this cell line for vaccine production. For oncogenicity they injected MDCK cell lysate and cell DNA into immunodeficient rats. For tumorigenicity they injected an intact MDCK cell suspension into immunodeficient mice. A HeLa cell suspension was used as a positive control.

Image timepoints:

First timepoint will be the at which the animals of the positive controlgroup start developing nodules, the second timepoint is at the end of experiment (human endpoint or end of observational period).

HeLa cells (positive control group):

HeLa cells comprise an immortalized, continuously cultured cell line of human cancer cells. Unlike normal body (somatic) cells, HeLa cells thrive indefinitely in laboratory tissue cultures, a trait that has allowed them to assume tremendous importance in biomedical research. Since the mid-twentieth century, the cells have been distributed around the world and used in innumerable medical endeavors, including investigations into the nature of cancer, the development of vaccines, the mapping of genes, the treatment of diseases, and the mechanisms involved with programmed cell death (apoptosis). The cell line arose in 1951 from samples collected during a biopsy on Henrietta Lacks, a poor 31-year-old African-American patient suffering from a cervical tumor. The designation HeLa, derived from the first two letters of her first and last names, was used to keep her identity anonymous. (Henrietta Lacks, who died later in

1951, was not publicly identified as the source of the cells for another two decades.) During subsequent investigations, the sample cells were found to behave abnormally. Unlike typical somatic cells, which undergo cell aging (senescence) and lose the ability to divide and replicate after a few dozen generations (the so-called Hayflick limit), the cells from Henrietta Lacks never stop dividing. Being tumor cells, HeLa cells also do not die from apoptosis, the mechanism that normally causes abnormal or unneeded cells to self-destruct. HeLa cells thus became the first line of human cells to survive indefinitely in vitro (under proper culture-growing conditions). The hardiness of these cells was noted early in the medical literature, resulting in numerous requests by other laboratories and research institutions for samples that could be cultured. As such, HeLa cells were disseminated around the world and became the basis for numerous medical studies that have benefited humankind. For example, Jonas Salk used HeLa cells in the work leading up to his creation of a vaccine for polio. In addition, HeLa cells were the first human cells to be cloned.

When results are inconclusive, we want to repeat this procedure in a second batch of animals at a later timepoint. Also, WHO guidelines (reference [16]) state that if the tumorigenicity group or the oncogenicity group show inconclusive results then the experiment should be repeated.

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.

Step1, Habituation:

1 week of habituation upon arrival of the animals to reduce stress levels

Step 2, Inoculation of the animals:

Positive control group: single injection of viable HeLa cells

Negative control group: single injection of vehicle

Tumorigenicity testgroup: single injection of viable ciPTEC-OAT1 cells

Oncogenicity test group: single injection of ciPTEC-OAT1 cell lysate

Step 3, Observation period and assessment of tumorigenicity and oncogenicity:

Animals will be observed three times per week. The animals will be weighed and their welfare will be carefully monitored. The body surface will be examined for tumors that may arise.

Assessment of the inoculation site over time:

If a nodule appears, it is measured in two perpendicular dimensions, the measurements being recorded two times per week to determine whether the nodule grows progressively, remains stable, or decreases in size over time. Moreover, at the time the first nodule appears, rats will be imaged to have more in-depth information on tumor formations and metastases.

Minimal observation period is 4 months (unless human endpoints are reached earlier), the maximal observation period is 6 months

Step 4; Final Assessment of the inoculation site and other sites:

At the end of the observation period, all animals, including the control groups, will be anesthetized and scanned using a whole body imager to screen for tumors and metastases. Next, animals will be euthanized and examined further for gross and microscopic evidence of tumour formation at relevant tissues.

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.

Validation of the procedure:

Progressively growing tumors should be produced in at least 9 of 10 animals injected with the positive control reference HeLa cells. At least 90% of the inoculated control cells must be positive for the test to be valid. Due to the nature of the HeLa cells, it is not expected that this percentage will be lower than 90% but if it does happen, we will repeat the experiment.

Assessment of the inoculation site over time:

If a nodule appears, it is measured in two perpendicular dimensions, the measurements being recorded weekly to determine whether the nodule grows progressively, remains stable, or decreases in size over time. Cell lines that produce nodules that fail to grow progressively are not considered to be tumorigenic.

Tumorigenicity:

Interpretation of results: The test is considered positive if at least 2 of 10 animals inoculated with the test article cells develop tumors at the site of inoculation or at a metastatic site or histologic or genotypic examination reveals that the nature of the cells constituting the tumors is consistent with that of the inoculated cells. If only one of 10 animals develops a tumor that meets the previous criteria, the cell line should be considered possibly tumourigenic and examined further.

Oncogenicity:

Interpretation of results: If tumours arise in the cell lysate or DNA assay, then these could be induced by an oncogenic virus or oncogenic DNA. The test is considered positive if at least 2 of 10 animals inoculated with the cell content develop tumors at the site of inoculation or at a metastatic site or histologic or genotypic examination reveals that the nature of the cells constituting the tumors is consistent with that of the inoculated the positive control reference cells. If only one of 10 animals develops a tumor that meets the previous criteria, the cell line should be considered possibly oncogenic and examined further.

Milestones:

minimal duration of the observational period: 4 months post-inoculation

maximal duration of the observational period: 6 months post-inoculation

early cessation of experiment: when human endpoint is observed as defined in the "Code of practice: proefdieren in kankeronderzoek"

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 | Tumorigenicity and oncogenicity in vivo |
| 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'. 10800
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Universiteit Utrecht
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|-----------------------------------------|
| 1 | Tumorigenicity and oncogenicity in vivo |

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

This project is a straightforward project with only one "type of animal procedure", which contains a single experiment with four treatment groups.

One positive controlgroup: This group is included to validate the test. Animals will receive viable HeLa cells which are known to induce tumors.

One negative controlgroup: This group will give us information about spontaneous tumor development in these animals under standard conditions. Animals will receive vehicle.

One tumorigenicity group: Tumors arising in this group are a direct outcome parameter for measuring tumorigenicity. Animals will receive viable kidney cells (ciPTEC-OAT1).

One oncogenicity group: Tumors or cancerous tissue arising in this group are a direct outcome parameter for measuring oncogenicity. Animals will receive a kidney cell lysate.

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

Step1, Habituation:

1 week of habituation upon arrival of the animals to reduce stress levels

Step 2, Inoculation of the animals:

Positive control group (n=10): single SC injection of 10^7 viable HeLa cells suspended in 0.1 ml PBS

Negative control group (n=10): single SC injection of 0.1 ml PBS

Tumorigenicity test group (n=10): single SC injection of 10^7 viable ciPTEC-OAT1 cells suspended in 0.1 ml PBS

Oncogenicity test group (n=10): single SC injection of cell lysate suspended in 0.05-0.1 ml

Injection site for all animals is the flank

Step 3, Observation period and assessment of tumorigenicity and oncogenicity:

Animals will be observed three times per week. The animals will be weighed and their welfare will be carefully monitored. The body surface will be examined for tumors that may arise.

Assessment of the inoculation site over time:

If a nodule appears, it is measured in two perpendicular dimensions, the measurements being recorded two times per week to determine whether the nodule grows progressively, remains stable, or decreases in size over time. Moreover, at the time the first nodule appears, rats will be imaged to have more in-depth information on tumor formations and metastases.

Minimal observation duration is 4 months, the maximal observation period is 6 months

Step 4; Final Assessment of the inoculation site and other sites:

At the end of the observation period, all animals, including the control groups, will be anesthetized and scanned using a whole body imager to screen for tumors and metastases. Next, animals will be euthanized and examined further for gross and microscopic evidence of tumour formation at relevant tissues. Any tumor that is identified is divided into three equal parts: a) fixed in formalin for histopathology; b) used to establish a cell line, when possible; and c) frozen for subsequent molecular analysis.

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

As this project is a safety study, we refer to the "WHO Expert Committee on Biological Standardization", Sixty-first report, p.137 in which the number of animals per treatment group is stated.

B. The animals

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

Species and origin:

For these studies, Hsd:RH-Foxn1^{tmu} rats from a registered breeding laboratory in the EU will be used (Envigo). This model is derived from animals obtained from the Rowett Research Institute, Aberdeen, Scotland. It is a T cell deficient rat model which is well established for oncology and transplantation research. We will use both males and females, preferably five per sex per group

Estimated numbers:

The "WHO Expert Committee on Biological Standardization", Sixty-first report, p.137 states that 10 animal per group should be used for the determination of tumor formation capacity. Since we have 4 treatment groups, the number of animals will be 40. As this is considered a single experiment, a repetition of the experiment in a different batch of animals at a later timepoint is warranted. The report states that if the tumorigenicity group or the oncogenicity group show inconclusive results then those groups should be repeated.

More precisely we refer to report page number 137, annex3, section B.8.5 "Number of test animals". Also, for tumorigenicity we refer to page 180, section 1, "number of test animals". For oncogenicity we refer to page 185, annex 3, section 4, "Number of test animals".

This brings the total amount of animals for this application to 80.

Life stage:

The rats will be 4 weeks old upon arrival. Younger animals are more susceptible regarding the development of 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:

A number of in vitro tests have already been done on ciPTEC-OAT1 kidney cells in the laboratory. Examples are SV40T expression, focus formation assay, anchorage independent growth assay, invasion assay, karyotyping and p53 and Rb activity. As all results were negative for potential risk, we aim to pursue our studies demonstrating safety in vivo.

Reduction:

Not applicable. We use the number of animals stated in the document "WHO Expert Committee on Biological Standardization", Sixty-first report, p.137.

Refinements:

If possible, we will house the animals in IVC cages to minimise infections. Also, we will frequently observe each animal. As animal model we will use the RNU nude rat. This is a susceptible rat specifically designed for oncology studies. We will euthanize animals that reach their human endpoint.

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

When animals develop severe adverse effects, we will euthanize them and examine the tissue. This way we will prevent adverse effect from maximising.

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 ciPTEC OAT1 cells are developed in our research group and we have ample experience with these cells. The experiments proposed in this application have never been performed, not in our group nor in collaborating groups that use our cells. Cell use outside our group is restricted because of a patent.

Repetition is required by safety regulations. The report states that if the tumorigenicity group or the oncogenicity group show inconclusive results then those groups should be repeated.

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?

Discomfort caused by the localisation of the tumor, anxiety, inflammation, diarrhea, constipation, paralysis.

Explain why these effects may emerge.

The above mentioned adverse effects are general effects of developing cancer in a body.

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

We will frequently observe for discomfort and apply the humane endpoints as defined in section J. Also, Paralysis and diarrhea are criteria for euthanasia.

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.

- Tumor mass: maximal acceptable tumormass 10%, \pm 40 cm³ or a 4,2 cm diameter.
- Weight loss: >15% of body weight in 2 days
- Severe clinical symptoms, Cachexia or when death is soon expected (moribund)

Indicate the likely incidence.

Positive control group: We expect at least 90% of the animals in this treatment group to develop severe symptoms.

Negative control group: We expect none of these animals to develop severe symptoms since the negative treatment group will receive a vehicle injection of PBS instead of cells or cell content.

Tumorigenicity testgroup: There is a chance that tumors or cancer will develop in this group. The likelihood is unknown and is exactly the aim of this project.

Oncogenicity test group: There is a chance that tumors or cancer will develop in this group. The likelihood is unknown and is exactly the aim of this project.

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').

This animal procedure "Tumorigenicity and oncogenicity in vivo" will be assigned to the category 'moderate'. The adverse effects are mentioned in section I. These possible developing effects will depend on when, where and how the tumor develops.

Positive control group: moderate (25%)

Negative control group: light (25%)

Tumorigenicity testgroup: moderate (25%)

Oncogenicity test group: moderate (25%)

Summary: 25% light discomfort and 75% moderate discomfort

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 observation period, all animals, including the reference group(s), are euthanized and examined for gross and microscopic evidence of tumor formation at the site of injection and in other sites. Any tumour that is identified is divided into three equal parts: a) fixed in formalin for histopathology; b) used to establish a cell line, when possible; and c) frozen for subsequent molecular analysis.

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

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

Yes



5.

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



Centrale Commissie Dierproeven

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002017879

Bijlagen

2

Datum 22 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 22 februari 2017. Het gaat om uw project "Tumorigenicity and oncogenicity in vivo of ciPTEC OAT1 kidney cells". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002017879. 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:

22 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD108002017879

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
22 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017879

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10800
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 30275924
Postbus: 12007
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT
IBAN: NL27INGB0000425267
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
22 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017879

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Post-doc onderzoeker
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED]
E-mailadres: [REDACTED]

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 april 2017
Geplande einddatum: 1 oktober 2018
Titel project: Tumorigenicity and oncogenicity in vivo of ciPTEC OAT1 kidney cells
Titel niet-technische samenvatting: Kanker bevorderende en tumorvormende eigenschappen van genetisch aangepaste niercellen.
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.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
Overige bijlagen: DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Utrecht
Datum: 16 februari 2017

Datum:
22 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017879



> 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
AVD108002017879
Bijlagen
2

Datum 22 februari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 22 februari 2017
Vervaldatum: 24 maart 2017
Factuurnummer: 170879
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

| Omschrijving | Bedrag |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002017879 | € 1035,- |

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD108002017879

Datum 24 februari 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 22 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Tumorigenicity and oncogenicity in vivo of ciPTEC OAT1 kidney cells" met aanvraagnummer AVD108002017879. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

In de NTS wordt gesproken over ernstig ongerief. In de bijlage dierproeven wordt het ongerief geclassificeerd als matig. Pas de documenten aan en stuur deze opnieuw in.

Bij de 3V's wordt aangegeven dat er waar mogelijk dieren in een IVC unit worden gehuisvest. Hoe voorziet u in adequate huisvesting als de dieren niet in een IVC gehuisvest worden, dit in relatie tot het gegeven dat u immunodeficiente dieren gebruikt.

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. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Datum:

24 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD108002017879

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



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'. 10800
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. Universiteit Utrecht
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|-----------------------------------------|
| 1 | Tumorigenicity and oncogenicity in vivo |

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

This project is a straightforward project with only one "type of animal procedure", which contains a single experiment with four treatment groups.

One positive controlgroup: This group is included to validate the test. Animals will receive viable HeLa cells which are known to induce tumors.

One negative controlgroup: This group will give us information about spontaneous tumor development in these animals under standard conditions. Animals will receive vehicle.

One tumorigenicity group: Tumors arising in this group are a direct outcome parameter for measuring tumorigenicity. Animals will receive viable kidney cells (ciPTEC-OAT1).

One oncogenicity group: Tumors or cancerous tissue arising in this group are a direct outcome parameter for measuring oncogenicity. Animals will receive a kidney cell lysate.

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

Step1, Habituation:

1 week of habituation upon arrival of the animals to reduce stress levels

Step 2, Inoculation of the animals:

Positive control group (n=10): single SC injection of 10^7 viable HeLa cells suspended in 0.1 ml PBS

Negative control group (n=10): single SC injection of 0.1 ml PBS

Tumorigenicity test group (n=10): single SC injection of 10^7 viable ciPTEC-OAT1 cells suspended in 0.1 ml PBS

Oncogenicity test group (n=10): single SC injection of cell lysate suspended in 0.05-0.1 ml

Injection site for all animals is the flank

Step 3, Observation period and assessment of tumorigenicity and oncogenicity:

Animals will be observed three times per week. The animals will be weighed and their welfare will be carefully monitored. The body surface will be examined for tumors that may arise.

Assessment of the inoculation site over time:

If a nodule appears, it is measured in two perpendicular dimensions, the measurements being recorded two times per week to determine whether the nodule grows progressively, remains stable, or decreases in size over time. Moreover, at the time the first nodule appears, rats will be imaged to have more in-depth information on tumor formations and metastases.

Minimal observation duration is 4 months, the maximal observation period is 6 months

Step 4; Final Assessment of the inoculation site and other sites:

At the end of the observation period, all animals, including the control groups, will be anesthetized and scanned using a whole body imager to screen for tumors and metastases. Next, animals will be euthanized and examined further for gross and microscopic evidence of tumour formation at relevant tissues. Any tumor that is identified is divided into three equal parts: a) fixed in formalin for histopathology; b) used to establish a cell line, when possible; and c) frozen for subsequent molecular analysis.

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

As this project is a safety study, we refer to the "WHO Expert Committee on Biological Standardization", Sixty-first report, p.137 in which the number of animals per treatment group is stated.

B. The animals

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

Species and origin:

For these studies, Hsd:RH-Foxn1^{tmu} rats from a registered breeding laboratory in the EU will be used (Envigo). This model is derived from animals obtained from the Rowett Research Institute, Aberdeen, Scotland. It is a T cell deficient rat model which is well established for oncology and transplantation research. We will use both males and females, preferably five per sex per group

Estimated numbers:

The "WHO Expert Committee on Biological Standardization", Sixty-first report, p.137 states that 10 animal per group should be used for the determination of tumor formation capacity. Since we have 4 treatment groups, the number of animals will be 40. As this is considered a single experiment, a repetition of the experiment in a different batch of animals at a later timepoint is warranted. The report states that if the tumorigenicity group or the oncogenicity group show inconclusive results then those groups should be repeated.

More precisely we refer to report page number 137, annex3, section B.8.5 "Number of test animals". Also, for tumorigenicity we refer to page 180, section 1, "number of test animals". For oncogenicity we refer to page 185, annex 3, section 4, "Number of test animals".

This brings the total amount of animals for this application to 80.

Life stage:

The rats will be 4 weeks old upon arrival. Younger animals are more susceptible regarding the development of 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:

A number of in vitro tests have already been done on ciPTEC-OAT1 kidney cells in the laboratory. Examples are SV40T expression, focus formation assay, anchorage independent growth assay, invasion assay, karyotyping and p53 and Rb activity. As all results were negative for potential risk, we aim to pursue our studies demonstrating safety in vivo.

Reduction:

Not applicable. We use the number of animals stated in the document "WHO Expert Committee on Biological Standardization", Sixty-first report, p.137.

Refinements:

If possible, we will house the animals in IVC cages to minimise infections. Alternatively, we will use filtertop cages or housing in a specialised infection unit to minimise infections. Also, we will frequently observe each animal. As animal model we will use the RNU nude rat. This is a susceptible rat specifically designed for oncology studies. We will euthanize animals that reach their human endpoint.

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

When animals develop severe adverse effects, we will euthanize them and examine the tissue. This way we will prevent adverse effect from maximising.

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 ciPTEC OAT1 cells are developed in our research group and we have ample experience with these cells. The experiments proposed in this application have never been performed, not in our group nor in collaborating groups that use our cells. Cell use outside our group is restricted because of a patent.

Repetition is required by safety regulations. The report states that if the tumorigenicity group or the oncogenicity group show inconclusive results then those groups should be repeated.

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?

Discomfort caused by the localisation of the tumor, anxiety, inflammation, diarrhea, constipation, paralysis.

Explain why these effects may emerge.

The above mentioned adverse effects are general effects of developing cancer in a body.

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

We will frequently observe for discomfort and apply the humane endpoints as defined in section J. Also, Paralysis and diarrhea are criteria for euthanasia.

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.

- Tumor mass: maximal acceptable tumormass 10%, \pm 40 cm³ or a 4,2 cm diameter.
- Weight loss: >15% of body weight in 2 days

- Severe clinical symptoms, Cachexia or when death is soon expected (moribund)

Indicate the likely incidence.

Positive control group: We expect at least 90% of the animals in this treatment group to develop severe symptoms.

Negative control group: We expect none of these animals to develop severe symptoms since the negative treatment group will receive a vehicle injection of PBS instead of cells or cell content.

Tumorigenicity testgroup: There is a chance that tumors or cancer will develop in this group. The likelihood is unknown and is exactly the aim of this project.

Oncogenicity test group: There is a chance that tumors or cancer will develop in this group. The likelihood is unknown and is exactly the aim of this project.

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').

This animal procedure "Tumorigenicity and oncogenicity in vivo" will be assigned to the category 'moderate'. The adverse effects are mentioned in section I. These possible developing effects will depend on when, where and how the tumor develops.

Positive control group: moderate (25%)

Negative control group: mild (25%)

Tumorigenicity testgroup: moderate (25%)

Oncogenicity test group: moderate (25%)

Summary: 25% mild discomfort and 75% moderate discomfort

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

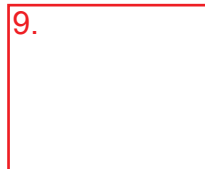
Yes > Explain why it is necessary to kill the animals during or after the procedures.

At the end of the observation period, all animals, including the reference group(s), are euthanized and examined for gross and microscopic evidence of tumor formation at the site of injection and in other sites. Any tumour that is identified is divided into three equal parts: a) fixed in formalin for histopathology; b) used to establish a cell line, when possible; and c) frozen for subsequent molecular analysis.

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

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

Yes



A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2016.II.859.028
2. Titel van het project : Tumorigenicity and oncogenicity in vivo of ciPTEC OAT1 kidney cells
3. Titel van de NTS : Kanker bevorderende en tumorvormende eigenschappen van genetisch aangepaste niercellen

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

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

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

- ontvangen door DEC: 10-01-2017
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 18-01-2017
- anderszins behandeld:
- termijnonderbreking(en) van / tot : 24-01-2017/03-02-2017
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 13-02-2017

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: 24-01-2017
- Datum antwoord: 03-02-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

Projectvoorstel

- 3.2 Doel: De zin: "*Information on the use of conditionally ...limits the risk minimally*". In wat cryptisch geformuleerd. Onderzoeker vragen deze zin begrijpelijk te herschrijven.
Herschreven in 'It is not known how humans respond to conditionally immortalized cell systems. Therefore, translation of negative results (i.e. no risk) to human is hampered. However, the choice of an immunodeficient animal model increases the reliability of such a translation.'
- 3.4 Onderzoeksstrategie: U geeft hier aan dat dezelfde maximale observatieperiode wordt gebruikt als Liu in zijn onderzoek. De DEC zou graag kort wat meer informatie willen over wat Liu onderzocht heeft.
Toegevoegd: 'Liu also studied the oncogenicity and tumorigenicity of kidney cells (the canine MDCK cell line). This study was done to ensure the safety of this cell line for vaccine production. For oncogenicity they injected MDCK cell lysate and cell DNA into immunodeficient rats. For tumorigenicity they injected an intact MDCK cell suspension into immunodeficient mice. A HeLa cell suspension was used as a positive control.'

Bijlage 1

- B. De dieren: U geeft aan dat een N=10 nodig is voor het bepalen van de oncogeniciteit, maar dit is niet in overeenstemming met het WHO rapport waarnaar u refereert. Dit dient aangepast c.q. verhelderd te worden.
Toegevoegd: 'More precisely we refer to report page number 137, annex 3, section B.8.5 "Number of test animals". Also, for tumorigenicity we refer to page 180, section 1, "number of test animals". For oncogenicity we refer to page 185, annex 3, section 4, "Number of test animals".'
 - E. Herhaling: U zegt hier: "*Repitition is required by safety regulations*". Volgens de DEC klopt dit echter niet, dit is alleen nodig bij inconsistente resultaten (volgens het WHO rapport). Graag wijzigen.
De volgende uitleg is toegevoegd: 'The report states that if the tumorigenicity group or the oncogenicity group show inconclusive results then those groups should be repeated.'
 - J. Humane eindpunten: Als humaan eindpunt noemt u >15% gewichtsverlies in 2 dagen of na het weekend. De DEC is echter van mening dat de dieren ook in het weekend gewogen dienen te worden. Graag wijzigen.
De tekst is aangepast in: '>15% gewichtsverlies in 2 dagen'.
 - K. Classificatie van ongerief: U schat het ongerief in als ernstig. De DEC ziet echter geen enkele reden om het onderzoek tot ernstig ongerief te laten voortduren en is van mening dat met maximaal matig ongerief ook aangetoond moet kunnen worden of, wanneer, waar en hoe er celgroei is. Graag uw visie.
We zijn het eens met de mening van de DEC en hebben ongerief aangepast.
- 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. Mensen met een ernstige ziekte waarbij de nier faalt, zijn op dit moment afhankelijk van twee behandelmethoden: 1) een niertransplantatie of 2) nierdialyse. Een niertransplantatie is de beste behandeling, maar de gemiddelde wachttijd voor een nier ligt momenteel op 3 jaar. Hierdoor kunnen sommige patiënten niet op tijd worden geholpen. De patiënten die wel een transplantatie ondergaan moeten vervolgens hun leven lang medicijnen slikken om afstoting van de donor te voorkomen, wat veel bijwerkingen met zich meebrengt. Het grootste deel van de patiënten ondergaat nierdialyse, een behandelmethode dat ongeveer 20% van de schadelijke stoffen uit het lichaam kan halen. Dat betekent dat 80% van deze schadelijke stoffen in het lichaam achterblijft en zich ophopen. Hierdoor ontstaan heftige bijwerkingen, zoals vermoeidheid en een groot risico op hart- en vaatziekten. Als alternatieve behandeling wordt de biologische kunstnier ontwikkeld. Deze kunstnier, die buiten het lichaam wordt aangesloten op de bloedbaan, is van binnen bekleed met menselijke (ciPTEC OAT1) niercellen, die ervoor zorgen dat het overgrote deel van de schadelijke stoffen in het lichaam verwijderd kunnen worden. De niercellen zijn genetisch aangepast zodat ze in het laboratorium op grote schaal gekweekt kunnen worden waarna ze in de kunstnier gebracht worden. Bij deze vorm van behandeling wordt geen afweerreactie verwacht. Er moet echter nog onderzocht worden of de niercellen veilig zijn wanneer zij in een levend organisme terechtkomen. Onderzocht zal worden of de niercellen tumoren kunnen vormen en of de inhoud van deze cellen op een indirecte manier kankerbevorderende eigenschappen heeft. Om die reden is deze studie aan te merken als een veiligheidsstudie, met een straight forward opzet. De relatie tussen het hoofdoel en het subdoel is 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 doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling(en).

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is de veiligheid van ciPTEC OAT1 niercellen in vivo bestuderen, door de tumorigeniciteit en de oncogeniciteit te bepalen. Het uiteindelijke doel van het project is de humane toepassing van de biologische kunstnier. Om de stap naar humane toepassing van de biologische kunstnier te kunnen maken, is het wettelijk verplicht eerst een veiligheidsstudie te verrichten. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, de doelgroep (nierdialyse patiënten) en het onderzoeksveld. De morele waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: welzijn (gezondheid en stress) en rechtvaardigheid (intrinsieke waarde en integriteit). De morele waarden die voor de doelgroep worden bevorderd zijn: welzijn (kwaliteit van leven) en rechtvaardigheid (beschikbaarheid van een veilige therapie). De morele waarden die voor het onderzoeksveld bevorderd worden zijn: welzijn (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. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC Utrecht is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen en blijven voldoen aan de 3V-beginselen om te voorkomen dat teveel proefdieren zullen worden ingezet en dat ze onnodig nadeel zullen ondervinden van de experimenten.
8. Om de tumorigeniciteit te bepalen worden ciPTEC-OAT1 cellen in de flank geïnjecteerd en voor het bepalen van de oncogeniciteit worden gelyseerde cellen, eveneens in de flank, geïnjecteerd. Vervolgens worden de dieren gedurende een periode van minimaal 4 en maximaal 6 maanden 3x per week geobserveerd en vanaf het moment dat zich tumoren ontwikkelen wordt de tumorgroei en metastasering 2x per week gemeten om te bepalen of de tumor groeit, stabiel blijft of afneemt. Aan het einde van de observatieperiode worden de dieren onder anesthesie geïmaged om alle tumoren in kaart te brengen. Hierna worden de dieren gedood om bloed en relevante weefsels nader te onderzoeken op de aanwezigheid van tumoren of kankercellen. De DEC is derhalve van mening dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor 25% van de dieren is het ongerief ingeschat op licht vanwege een subcutane injectie met een zoutoplossing. De overige 75 % van de dieren zal maximaal matig ongerief ervaren vanwege de subcutane injectie en de mogelijke ontwikkeling van tumoren.
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast door het toedienen de subcutane injectie, waardoor al dan niet tumoren zullen gaan groeien.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage dierproeven goed gedefinieerd. Het is echter lastig in te schatten welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt bereikt. De onderzoeker verwacht dat 90% van de dieren in de positieve controle groep het humane eindpunt bereikt. Van de negatieve controle groep wordt verwacht dat geen van de dieren het humane eindpunt bereikt omdat zij enkel een zoutoplossing krijgen toegediend. Van de tumorigeniciteit en oncogeniciteit groep is nog niet aan te geven of zich tumoren zullen ontwikkelen; het is juist het doel van dit onderzoek om dat uit te zoeken.
- 3V's
14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Er hebben reeds *in vitro* experimenten plaatsgevonden, waarbij de resultaten negatief waren. Volgens veiligheidsvoorschriften dient dit ook *in vivo* bevestigd te worden alvorens de translatiestap gemaakt kan worden.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Omdat dit project een veiligheidsstudie betreft, is

het aantal dieren per behandelgroep gebaseerd op de "WHO Expert Committee on Biological Standardization", Sixty-first report, p.137.

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. Voor het project worden RNU naakte ratten gebruikt, welke zeer geschikt zijn voor oncologiestudies doordat zij een verminderde afweer hebben en daardoor vatbaarder zijn voor het ontwikkelen van tumoren, waardoor de gevoeligheid van de veiligheidstest toeneemt. Vanwege de verminderde afweer zijn de dieren ook vatbaarder voor het krijgen van infecties. Om die reden zullen de dieren, indien mogelijk, gehuisvest worden in IVC kooien. De dieren worden daarnaast regelmatig geobserveerd om ongerief tijdig te kunnen vaststellen en onnodig lijden te voorkomen.
17. De niercellen die in dit onderzoek worden getest op veiligheid zijn ontwikkeld door de aanvrager. Hiermee is aannemelijk gemaakt dat er geen duplicatie plaatsvindt en de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden ingezet.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood, omdat de doelstellingen van het project alleen behaald kunnen worden door de dieren te onderzoeken op de aanwezigheid van tumoren of kankercellen. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood.
20. Omdat in het projectvoorstel ratten 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 morele vraag die de DEC dient te beantwoorden is of het belang van dit onderzoek, gericht op het in vivo bestuderen van de veiligheid van menselijke ciPTEC OAT1 niercellen, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.

2. Er vindt een beperkte tot aanzienlijke aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met licht ongerief voor een kwart van de dieren en maximaal matig voor de dieren die mogelijk tumoren ontwikkelen. Daar staat tegenover dat dit onderzoek belangrijke informatie geeft over de veiligheid van de ciPTEC OAT1 niercellen in vivo en dat deze informatie op korte termijn van essentieel belang is voor vervolgonderzoek. Uiteindelijk kunnen de resultaten van het voorliggende onderzoek en eventuele vervolgonderzoeken ertoe bijdragen dat een finale stap kan worden gemaakt, namelijk translatie van de biologische kunstnier naar de mens. De DEC kent daar veel gewicht aan toe. Mensen met ernstige nierfalen, zijn op dit moment afhankelijk van twee suboptimale behandelmethoden, namelijk niertransplantatie of nierdialyse. Er is derhalve grote vraag naar een nieuwe behandelmethode. Indien deze veiligheidsstudie laat zien dat de ciPTEC OAT1 niercellen in vivo geen tumoren vormen en ook de inhoud van deze cellen op een indirecte manier geen kankerbevorderende eigenschappen hebben, dan zal dit project er toe bijdragen dat patiënten betere behandelmogelijkheden krijgen. Het is aannemelijk dat de translationele doelstelling behaald zal worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Dat het voor het onderzoeksveld van belang kan zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken is juist, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC daar weinig gewicht aan toe.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het verrichten van deze veiligheidsstudie een essentieel belang vertegenwoordigt en dat dit essentiële belang opweegt tegen de beperkte tot aanzienlijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. Het gebruik van de proefdieren zoals beschreven in de aanvraag is daarmee gerechtvaardigd.

E. Advies

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002017879
Bijlagen
1

Datum 20 maart 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 22 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Tumorigenicity and oncogenicity in vivo of ciPTEC OAT1 kidney cells" met aanvraagnummer AVD108002017879. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Beslissing

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

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

U kunt met uw project "Tumorigenicity and oncogenicity in vivo of ciPTEC OAT1 kidney cells" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 april 2017 tot en met 1 oktober 2018.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 13 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. 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.

Datum:

20 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD108002017879

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

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


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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Ir. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Utrecht

Adres: Postbus 12007

Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 april 2017 tot en met 1 oktober 2018, voor het project "Tumorigenicity and oncogenicity in vivo of ciPTEC OAT1 kidney cells" met aanvraagnummer AVD108002017879, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 22 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 20 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 13 februari 2017, ontvangen op 20 februari 2017.

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|---------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|---------------|------------------------------|-------------|
| 1: Tumorigenicity and oncogenicity in vivo | | | | |
| | Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Hsd:RH-Foxn1rnu rats | 80 | 75% Matig 25% Licht | |

Voorwaarden

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

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

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

Aanvraagnummer:
AVD108002017879

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:

AVD108002017879

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:

AVD108002017879

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 2017888 | reeds openbaar | niet | geheel | deels | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 | |
| 1 | Aanvraagformulier | | | | x | | x | x | | |
| 2 | NTS initieel | | | x | | | | | | |
| 3 | Projectvoorstel | | | x | | | | | | |
| 4 | Bijlage beschrijving dierproeven | | | x | | | | | | |
| 5 | Ontvangstbevestiging en factuur | | | | x | | x | x | | |
| 6 | DEC-Advies | | | | x | | x | x | | |
| 7 | Verzoek om aanvullende informatie | | | | x | | x | x | | |
| 8 | NTS herzien | x | | | | | | | | |
| 9 | Advies CCD | | x | | | | | | x | |
| 10 | Beschikking en vergunning | | | | x | | x | x | | |



1.

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven *Administratieve gegevens*

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

1 Gegevens aanvrager

| | | | |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| 1.1 | Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i> | <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in | 50100 |
| | | <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 | TNO |
| | | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | ██████████ |
| | | KvK-nummer | 27376655 |
| | | Straat en huisnummer | |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | Postbus | 96800 |
| | | Postcode en plaats | 2509 JE DEN HAAG |
| | | IBAN | NL39INGB0657819271 |
| | | Tenaamstelling van het rekeningnummer | TNO |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker. | (Titel) Naam en voorletters | ██████████ <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
| | | Functie | Onderzoeker |
| | | Afdeling | ████████████████████ |
| | | Telefoonnummer | ██████████ |
| | | E-mailadres | ████████████████████ |
| 1.5 | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker. | (Titel) Naam en voorletters | ██████████ <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
| | | Functie | Onderzoeker |
| | | 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?
- Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|----------------|
| Startdatum | 01 - 01 - 2018 |
| Einddatum | 31 - 12 - 2023 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Bestuderen van functie en farmacokinetiek in organen (darm/lever/nier) voor wetenschappelijk onderzoek
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Bestuderen van functie en farmacokinetiek in organen (darm/lever/nier) voor wetenschappelijk onderzoek
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|------------------------|
| Naam DEC | DEC-TNO |
| Postadres | 96800 2509 JE DEN HAAG |
| E-mailadres | |

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 o.v.v. order nummer **3100159571/1**

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 | Den Haag |
| Datum | 28 - 02 - 2017 |
| Handtekening | |



Format

Niet-technische samenvatting

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

1 Algemene gegevens

| | |
|------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1.1 Titel van het project | Bestuderen van functie en farmacokinetiek in organen (darm/lever/nier) voor wetenschappelijk onderzoek |
| 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | geïsoleerde orgaan functie, Lever, Nier, Darm |

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | <p>Het aantal patiënten met overgewicht en de daarbij behorende gezondheidsproblemen neemt toe. Deze patiënten krijgen vaak te maken met problemen waardoor de werking van de darm, de nier en de lever verstoord raken.</p> <p>Darm, nier en lever spelen een hele belangrijke rol bij zowel de opname van stoffen (met name het maag-darm kanaal), als bij het omzetten van deze stoffen (lever en darm) en het uitscheiden van stoffen (nier, lever). Begrip van deze processen (kinetiek genoemd) en interactie van stoffen in een minder functioneel orgaan kan gebruikt worden om dosering aan te passen voor deze patiënten. Daarnaast kunnen bijwerkingen voorkomen of beter voorspeld worden. Om dit te kunnen bepalen is het nodig om gebruik te maken van goede voorspelbare methode. Wij willen ex vivo (buiten het</p> |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

lichaam) de functie en kinetiek van stoffen bestuderen in darm, lever en nier. Deze orgaanmodellen kunnen dan gebruikt worden om kinetiek van medicijnen en voedingsstoffen in ziekte en gezondheid te bestuderen. Het doel is om deze methode op te zetten in organen van dieren maar om uiteindelijk over te gaan op menselijk materiaal (zoals afgekeurde donor organen of materiaal dat beschikbaar komt na operatie). We verwachten dat door gebruik te maken van modellen die op de mens lijken, en uiteindelijk ook humaan materiaal, de ontwikkeling van nieuwe medicijnen en therapeutica sneller kan plaatsvinden en dat deze sneller op de markt zullen komen.

Afhankelijk van de vraagstelling kan gebruikt gemaakt worden van slachthuisafval of van organen van proefdieren die voor een ander doeleinde zijn gedood. Het is echter in sommige gevallen noodzakelijk om materiaal te gebruiken van dieren die speciaal voor dit onderzoek gedood zijn.

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang? | <p>1). De ontwikkeling van een model om ex vivo darm, lever en nierfunctie te kunnen bestuderen</p> <p>2). Kennis over hoe bovenstaande organen invloeden van buitenaf, zoals voedingsstoffen, medicijnen of ziekteverwekkers, verwerken.</p> <p>3). Kennis over de functie van bovenstaande organen en mogelijk nieuwe manieren om functie van deze organen ex vivo te kunnen meten.</p> |
| 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt? | Varkens, geschatte aantal bedraagt 120 dieren over periode van 5 jaar |
| 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren? | <p>95% van de experimenten zal onder terminale anesthesie plaatsvinden</p> <p>In 5% van de gevallen zullen dieren voorbehandeld worden met een stof (medicijn/voedingsmiddel). Bij voorkeur zal deze teststof worden toegediend via het voer (1%). Een deel van de proeven zal een stof worden toegediend voorafgaand aan de proef maar wel onder terminale anesthesie (2-3%). Bij 1-2% zal een injectie zonder anesthesie worden toegepast. Dit geeft licht ongerief.</p> |
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst? | Terminaal (98-99%) en licht (1-2%) |
| 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop? | <p>Dieren zullen na afloop van de proef gedood worden. We streven ernaar om zoveel mogelijk gebruik te maken van slachtafval of restorganen van andere proeven. Ook willen we overige organen uit onze proefdieren ter beschikking stellen voor ander wetenschappelijk onderzoek.</p> |

4 Drie V's

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>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> | <p>Gebruik maken van puur in vitro systemen is voor complexe organen nog niet mogelijk. Ook is er weinig humaan materiaal beschikbaar om deze meetmethode te zetten. We willen uiteindelijk gebruik maken van humaan weefsel maar gebr als tussenstap het varken om de methode op te zetten.</p> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

4.2 **Vermindering**

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

We dragen bij aan het verminderen van dierproeven doordat we voor kinetiek studies gebruik willen maken organen in plaats van grote aantallen knaagdieren. We verwachten dat de methode zo robuust en voorspelbaar zal zijn dat er een veel lager aantal proefdieren nodig is. Ook zullen we, daar waar mogelijk, gebruik maken van slachtafval of restorganen afkomstig uit andere proeven en zoveel mogelijk de darm, lever en nier experimenten te combineren zodat er uit 1 dier meerdere organen gebruikt kunnen worden. Ook zullen we na isolatie van de organen de dieren en/of organen ter beschikking stellen voor overig kortdurend wetenschappelijk onderzoek dat onder terminale anesthesie plaats kan vinden. We maken nu al gebruik van bestaande nationale samenwerkingen waarbij organen gedeeld worden en daarnaast zullen we samenwerkingen opzetten met andere instellingsvergunninghouders om zoveel mogelijk toegang te krijgen tot restmateriaal. We zullen actief meewerken aan een landelijk initiatief om proefdiermateriaal te delen.

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.

Verfijning vindt plaats doordat we niet meer in het levende dier naar het effect van een stof willen kijken en daarvoor het gehele dier moeten behandelen (met de eventuele bijwerkingen) maar dat we direct het effect van een stof op het orgaan kunnen bestuderen.

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

Dieren zullen bij aankomst worden geacclimatiseerd en door een bevoegd en bekwaam dierenarts onder terminale anesthesie worden gebracht

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 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.

Het aantal patiënten met metabole dysfunctie neemt toe. Deze patiënten krijgen vaak te maken met metabole complicaties waaronder het dysfunctioneren van de darm, de nier en de lever.

Darm, nier en lever spelen een hele belangrijke rol bij zowel absorptie van stoffen (met name het maag-darm kanaal), als bij de metabolisatie (lever en darm) en excretie van stoffen (nier, lever). Begrip van de kinetiek en interactie van stoffen in een (dys)functionerend orgaan kan in klinische setting gebruikt worden om dosering aan te passen voor specifieke omstandigheden in de patiënt (met verstoorde nier/lever/darm functie). Daarnaast kunnen bepaalde bijwerkingen die bijvoorbeeld veroorzaakt worden door drug-drug interactie voorkomen worden. Om dit te kunnen bepalen is het nodig om gebruik te maken van goede voorspelbare en translationele methode. **Wij willen ex vivo de functie en farmacokinetiek van stoffen bestuderen in darm, lever en nier. Deze ex vivo modellen kunnen dan gebruikt worden om kinetiek en metabolisme van medicijnen en nutriënten in ziekte en gezondheid te bestuderen, denk hierbij aan, o.a (verstoorde) klaring door de lever of nier en opname in de darm.** Het doel is om deze methode op te zetten in dierlijk materiaal maar om uiteindelijk over te gaan op humaan materiaal (zoals afgekeurde donor organen of materiaal dat beschikbaar komt na operatie). Het uiteindelijke doel is, door gebruik te maken van translationele modellen, en uiteindelijk ook humaan materiaal, de ontwikkeling van nieuwe medicijnen en therapeutica sneller te laten plaatsvinden en beschikbaarheid op de markt te versnellen.

Darm: Voor de darm studies willen we gebruik maken van een al bestaand systeem nl het InTESTine™ platform. Dit is een medium throughput platform, wat betekent dat we met 1 stuk darmweefsel meer dan 96 condities kunnen testen. Afhankelijk van de vraagstelling kan gebruik gemaakt worden van slachthuisafval of dieren die voor een ander doeleinde zijn gedood. Het is echter in sommige gevallen (bijvoorbeeld wanneer intacte mucosa nodig is) wenselijk om vers darmweefsel te gebruiken.

Lever en nier: We willen voor de lever en nier ook een ex vivo model opzetten om meer informatie te krijgen over hoe deze organen met triggers van buitenaf, zoals nutriënten, bacteriën of farmaca, omgaan en op welke manier ze een rol spelen in de farmacokinetiek van een bepaalde stof in ziekte en gezondheid. Farmacokinetische studies met bekende drugs zullen in dit model worden getest en vergeleken met bekende in vivo data. Als het model goed voorspellend is voor de in vivo situatie zullen het model gebruikt worden om nieuwe drugs te testen. Deze kennis zal bijdragen aan het verbeteren en versnellen van klinische studies en kan leiden tot een versnelde beschikbaarheid voor de patiënt. Ook kan men informatie verkrijgen over drug-drug interactie in organen waarin de functie verstoord is. Vooral voor de nier is er een gebrek aan goede functionele en voorspellende markers, met name vanwege de complexiteit van dit orgaan. In de kliniek is het vaak een probleem dat nierfalen pas wordt gediagnosticeerd op het moment dat patiënt zich al in een vergevorderd stadium bevindt. Daarom willen we onderzoeken of microdosering van (radioactief) gelabelde stoffen gebruikt kan worden om de lever en nier functie op een betrouwbare en veilige manier te meten en of we deze methode kunnen gebruiken om mogelijk nieuwe markers te identificeren. In het verleden is al aangetoond dat microtracing voor de darm een veilige en betrouwbare methode is.

In de voorgestelde ex vivo setup kan men heel gericht in 1 geïsoleerd orgaan naar de functie en/of farmacokinetiek van een bepaalde stof kijken.

Om de functie en de manier waarop een orgaan omgaat met stoffen goed te kunnen bestuderen is het noodzakelijk om vers/levend weefsel te gebruiken. Dit kan afkomstig zijn van slachtafval, van dieren die voor een ander doel zijn gedood maar waarvan deze organen beschikbaar zijn, van dieren die (eventueel voorbehandeld) voor een specifieke vraagstelling zijn gedood of humaan materiaal (zoals afgekeurde transplantatie organen of restmateriaal na operatie). Dit wordt verder besproken in 3.4

3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

- In het geval het project gericht is op één of meer onderzoeksdoelen: op welke vra(a)g(en) dient dit project antwoord(en) te verschaffen?

- In geval het een ander dan een onderzoeksdoel betreft: in welke concrete behoefte voorziet dit project?

Het doel van het onderzoek is het bestuderen van functie, kinetiek en metabolisme van stoffen in een geïsoleerd orgaan. Het gaat hierbij specifiek om first-pass organen zoals darm, lever en nier. Dit zal in preklinische setting plaatsvinden om de methode op te zetten en te valideren. Het achterliggende doel is om de verworven kennis uiteindelijk toe te passen op humaan materiaal.

Voor de darm is al methodologische ervaring met het ex vivo bestuderen van functie en farmacokinetiek in dierlijk materiaal.

De volgende vragen zullen o.a. beantwoord worden:

Darm:

- Wat zijn de verschillen in regionale absorptie (duodenum, jejunum, ileum, colon) van stoffen, en wat is het verschil tussen species (varken versus humaan – voor de vertaalslag heel belangrijk)? Dit helpt te bepalen in hoeverre resultaten 1:1 vertaald kunnen worden naar de mens en waar aanvullende informatie vereist is.
- Welke invloed hebben externe factoren (omgeving, stress, behandeling, ziekte, ontsteking) op de darmdoorlaatbaarheid van stoffen en hoe kunnen we die moduleren.

Voor de lever en nier zal eerst de ex vivo meet methode opgezet moeten worden. Dit is het eerste doel van deze aanvraag. Het tweede doel van deze aanvraag is om in deze ex vivo modellen de farmacokinetiek van stoffen te bestuderen in gezondheid en ziekte.

Doelstellingen voor het opzetten van de meet methode zijn oa:

- Lever en nier minimaal 4 uur stabiel laten functioneren ex vivo. Uit literatuur is bepaald dat dit de minimale tijd is die nodig is om een experiment uit te voeren waarin zowel functie als klaring van een stof kan worden bestudeerd.
- Ex vivo induceren van schade aan het orgaan zodat farmacokinetiek ook in ziek orgaan kan worden bestudeerd. Dit zal niet voor chronische schade mogelijk zijn maar wel voor acute schade.
- Identificeren van functionele en voorspellende markers voor ex vivo functie en correleren aan humane data
- Meten van farmacokinetiek van referentie stof en uitkomst vergelijken met in vivo data uit humane data sets of literatuur.

Doelstellingen voor het tweede deel zijn:

- Meten van farmacokinetiek (bijvoorbeeld drug-drug interactie) van bekende en onbekende stoffen in preklinische setup .
- Testen van functionele markers in ex vivo setup in gezonde en zieke organen.

Dit project heeft een hoge haalbaarheid doordat de betrokken onderzoeksgroepen veel expertise hebben op het gebied van farmacokinetiek en metabole ziekten. De onderzoeksgroepen hebben een brede expertise op het gebied van voorspellen en moduleren van kinetiek van oa voedingsstoffen en medicijnen in gezondheid en ziekte. De onderzoeksgroep bestaat uit onderzoekers met ruime ervaring in het bestuderen van farmacokinetiek in zowel in vivo en in vitro settings en onderzoekers die ervaring hebben met het bestuderen van metabole complicaties in vivo, waaronder leveraandoening en nierfalen. Afgelopen jaren is gewerkt aan het opzetten van een ex vivo darmmodel waarbij oa gebruik werd gemaakt van rest materiaal van varkens. De kennis hiervan wordt ook toegepast bij de praktische problemen die we tegenkomen bij de andere organen. Door deze kennis van meerdere onderzoeksgroepen binnen het instituut te combineren kunnen we optimaal gebruik maken van de aanwezig expertise binnen de onderzoeksgroepen. Ook zijn er veel (inter)nationale samenwerkingen waarbinnen de proefopzet en resultaten zullen worden getoetst.

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk:

Doordat het aantal patiënten met metabole complicaties blijft stijgen ontstaat er een steeds grotere behoefte aan nieuwe medicatie voor deze patiënten. In deze patiënten zijn oa de lever, nier en darm aangedaan. Om gericht geneesmiddelen te kunnen ontwikkelen is het belangrijk om te begrijpen hoe stoffen door deze organen worden behandeld om zo een uitspraak te kunnen doen over mogelijke dosering, bijwerkingen en interacties met andere stoffen of geneesmiddelen. Door middel van deze studies hopen we beter inzicht te krijgen in de onderliggende mechanismen die een rol spelen bij farmacokinetiek van stoffen in de verschillende organen.

Maatschappelijk belang:

Begrip van de kinetiek en interactie van stoffen in een (dys)functionerend orgaan kan in klinische setting gebruikt worden om dosering aan te passen voor specifieke omstandigheden in de patiënt (met verstoorde nier/lever/darm functie). Daarnaast kunnen bijwerkingen door drug-drug interactie voorkomen worden. Het goed kunnen voorspellen van de effecten van nieuwe therapeutica kan bijdragen aan het reduceren van klinische trials en de kans op falen in zo'n trial verlagen, wat een kostenverlagend effect heeft. Uiteindelijk kunnen beter voorspelbare modellen ook bijdragen aan het verkorten van de tijd die nu nodig is om nieuwe therapeutica op de markt te brengen. Dit kan leiden tot goedkopere medicatie voor de patiënt. Dit heeft socio-economische impact op samenleving en maatschappij. Ex vivo experimenten met restmateriaal of slachthuis materiaal kan leiden tot vermindering van het aantal dierproeven. Betere voorspelbare modellen kunnen bijdragen aan verfijning van dierproeven.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

De onderzoeksstrategie voor de darm ziet er als volgt uit:

Voor darm:

- 1). Verder bouwen aan bestaande methodologische kennis mbv ex vivo experimenten om zo meer kennis te genereren of (dys)functie van de verschillende compartimenten van de darm in dierlijk weefsel
- 2). Validatie van deze kennis door het bestuderen van farmacokinetiek van een bekende stof in verschillende compartimenten van de darm.
- 3). Deze kennis en resultaten toetsen aan humane literatuur
- 4). Testen van experimentele onbekende stoffen (voedingsstoffen/medicijnen) in ex vivo setup met varkensmateriaal verkregen uit slachthuismateriaal of, indien noodzakelijk, uit voor proef opgeofferd dier.
- 5). Verder opzetten toegang tot humaan weefsel
- 6). Opgebouwde methodologische en inhoudelijke kennis toetsen en toepassen op humaan materiaal

Voor de nier en lever weten we uit de literatuur dat het mogelijk is om de organen voor een bepaalde periode (ongeveer 6 uur) ex vivo in leven te kunnen houden. Dit moeten we eerst zelf ook praktisch kunnen uitvoeren. We maken hierbij veel gebruik van de bestaande kennis uit het transplantatie veld, we zijn op bezoek geweest bij een groep in Leicester waar ook ex vivo lever en nier experimenten worden gedaan, maar moeten dit nog wel zelf verder opzetten. Hiervoor zijn pilot experimenten nodig.

Experimenten en validatie experimenten die met de lever en de nier uitgevoerd moeten worden:

Opzetten technisch protocol, waarbij levensduur en functie de belangrijkste uitleesparameters zullen zijn. Voor functie is bij de lever is oa galproductie, bloedgas pH, glucose en lactaat een standaard uitlezing (in transplantatie setting). Voor de nier is dit oa klaring (inuline, PAH, creatinine), natrium en kalium excretie en eventueel glucose. Als we dit praktisch in de vingers hebben dan moet er gekeken worden hoe de ex-vivo organen omgaan (o.a. omzetten en excretie) met bepaalde stoffen/medicijnen waarvan bekend is hoe deze in de mens worden verwerkt in vivo (validatie-experimenten). Dit zal vergeleken worden met de literatuur en humane data.

We verwachten hierbij dat de varkens organen hierin weinig verschillen met de mens en dat de resultaten overeen zullen komen met de gegevens bekend uit literatuur. Als we dit hebben kunnen bevestigen dan zullen ook experimentele studies uitgevoerd worden waarbij medicijnen zullen worden getest die zich nog in de ontwikkelingsfase bevinden, dit zal in samenwerking met oa farmaceutische industrie worden gedaan. Ook hierbij zal de nadruk altijd zal liggen op het verbeteren van gezondheid van de mens.

De keuze om gebruik te maken van slachthuismateriaal of ex-vivo (vers) materiaal zal samenhangen met de kennis

over de stof en het type orgaan. Voor lever en nier zal voor het technische opzetten zeker gekozen worden voor restmateriaal van andere proef of slachthuis, voor experimentele vragen zal dit per te testen stof of vraagstelling bekeken moeten worden.

Deze stappen zijn ook hieronder nogmaals stapsgewijs beschreven:

- 1). opzetten mogelijkheid om ex vivo nier en lever functie en farmacokinetiek te kunnen bestuderen in dierlijk weefsel. Hierbij zal gekeken worden naar functionele parameters, als die vergelijkbaar zijn met gegevens bekend uit de transplantatie wereld kunnen we ook farmacokinetische studies uitvoeren in een werkend orgaan.
- 2). Uitvoeren van validatie studies in dierlijk weefsel waarin klaring van een bekende stof wordt getest ex vivo.
- 3). Validatie experimenten vergelijken met bekende literatuur en humane data
- 4). Testen van experimentele onbekende stoffen (voedingsstoffen/medicijnen) in ex vivo setup met varkensmateriaal verkregen uit slachthuismateriaal of, indien noodzakelijk, uit voor proef opgeofferd dier.
- 5). Opgebouwde methodologie en inhoudelijke kennis toetsen en toepassen op humaan materiaal.

Het uiteindelijke doel is om met humaan weefsel de experimenten te doen. Hiervoor hebben we contact met lokale en academische ziekenhuizen, organisaties gespecialiseerd in transplantatie en is er een initiatief van TNO om een landelijke humane weefsels supply chain voor wetenschappelijk onderzoek in Nederland op te zetten.

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

Alle studies zullen plaatsvinden in organen van grote proefdieren (varkens). Afhankelijk van de vraag zal gekozen worden voor een klein of groot varken. Indien mogelijk zal gebruik worden gemaakt van slachthuismateriaal. Er wordt gekozen voor varkens omdat het maag-darm kanaal, de nier en de lever grote overeenkomsten vertonen met de mens. Voor lever en nier wordt gebruik gemaakt van apparatuur die ontwikkeld is voor de humane toepassing. Ook hiervoor is het gebruik van varkens materiaal het meest geschikt daar de anatomie grotendeels overeenkomt.

Darm: ex vivo permeabiliteits/ PK studies zullen uitgevoerd worden voor verschillende wetenschappelijke doeleinden waaronder het bestuderen van het effect van allergenen op de darmpermeabiliteit en de samenstelling en functie van de mucosa.

Lever en nier:

Opzetten van ex vivo perfusie experimenten. Indien mogelijk zullen we voor de pilot experimenten gebruik maken van organen afkomstig van dieren die voor een andere proef/andere doeleinden gedood zijn. Als methode gevalideerd is zullen studies worden opgezet om PK en drug-drug interacties van therapeutica te bestuderen.

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.

Voor de darm worden regelmatig experimenten uitgevoerd om de kinetiek van stoffen (nieuwe geneesmiddelen) in de darm te bestuderen. Om een zo volledig mogelijk beeld te krijgen van de effecten van een stof kunnen we nu ook data afkomstig van verschillende organen met elkaar koppelen.

Voor nier en lever zijn er een aantal methodologische doelen die eerst behaald moeten worden. Hierbij zijn een aantal milestones en GO/NoGo momenten gedefinieerd.

Milestone 1: Lever en/of nier functioneel te houden (minimaal 4 uur) in ex vivo perfusie set up. Functie wordt bepaald door op uiterlijke kenmerken te focussen zoals kleur, urine/gal productie, maar ook op meetbare uitlezingen zoals lactaat en PH voor de lever en GFR voor de nier.

G/NG: tijdsduur moet uitwijzen of de organen lang genoeg stabiel blijven om een betrouwbaar experiment te doen
Milestone 2: Bepalen van betrouwbare functionele en/of voorspellende read outs. We willen hier bovengenoemde markers valideren en waar mogelijk uitbreiden of verfijnen.

G/NG: bekende functie markers voor lever (bijv lactaat/AST/ALT) en voor de nier (creatinine, inuline) moeten te detecteren zijn en moeten geen grote spreiding laten zien.

Milestone 3: kinetiek van referentie compound bestuderen in ex vivo setup en vergelijken met bekende in vivo data
G/NG: als waarden niet overeenkomen moet nagedacht worden of model geschikt is.

Indien bovenstaande milestones behaald zijn is het model geschikt gebleken voor het type studies dat we in de toekomst willen gaan uitvoeren en kunnen andere vragen zoals beschreven in 3.2 onderzocht worden.
Uiteindelijk is het doel om alle opgedane kennis vanuit het varken te gebruiken bij experimenten op humane organen.

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

| Volgnummer | Type dierproef |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | Ex vivo bestuderen van functie en farmacokinetiek van stoffen in lever/nier/darm |
| 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. | 50100 | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|----------------|---------|----------------------------------------------------------------------------------|
| 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in. | TNO | | | | |
| 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in. <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | <table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>3.4.4.1</td><td>Ex vivo bestuderen van functie en farmacokinetiek van stoffen in lever/nier/darm</td></tr></tbody></table> | Volgnummer | Type dierproef | 3.4.4.1 | Ex vivo bestuderen van functie en farmacokinetiek van stoffen in lever/nier/darm |
| Volgnummer | Type dierproef | | | | |
| 3.4.4.1 | Ex vivo bestuderen van functie en farmacokinetiek van stoffen in lever/nier/darm | | | | |

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Uit varkens worden darmen, lever en nier geïsoleerd om ex vivo studies te kunnen uitvoeren. Organen zullen worden aangesloten op een orgaanperfusiesysteem en/of geïmplementeerd in ex vivo model en functie en kinetiek van stoffen zullen bestudeerd worden. Op die manier kan met 1 dier verschillende condities getest worden.

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.

Onder terminale anesthesie zullen organen worden geïsoleerd, gecanuleerd en overgebracht naar orgaan perfusiesystemen. Hierna zal het dier worden getermineerd of ter beschikking worden gesteld voor andere onderzoeksdoeleinden.

Indien nodig dan zullen de dieren voorafgaand aan de isolatie, terwijl ze al onder anesthesie zijn, gehepariniseerd worden. Dit om stolling van bloed in de organen te voorkomen, dit kan de metingen verstoren.

Onder farmacokinetiek valt ook het bestuderen van drug-drug interacties. Hiervoor kan het nodig zijn dat er voorafgaand aan het experiment in vivo al een bepaalde plasma spiegel of concentratie van de te bestuderen stof aanwezig moet zijn om de interactie van een andere stof hierop ex vivo te kunnen bestuderen. Hiervoor kan het nodig zijn om de dieren voorafgaand aan terminatie of onder terminale anesthesie een oplaad dosis krijgen of vooraf worden behandeld met de stof. Manier van toediening zal afhankelijk zijn van de te testen stof, bij voorkeur zal oraal worden toegediend (bijvoorbeeld via het voer of met capsule), first pass effect is immers via de lever en hiervoor is dat de meest logische route. Indien

nodig zal er bloedafname, speeksel, faeces en/of urine verzameling plaats vinden.

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

Aantal dieren per studie en per groep is afhankelijk van de vraagstelling, diersoort, en belangrijkste uitleesparameters.

Omdat we voor ex vivo perfusie van lever en nier nog geen pilotdata beschikbaar hebben kan op dit moment nog geen onderbouwde poweranalyse gedaan worden. We willen eerst een pilot experiment uitvoeren waarin de eerder genoemde technologische vragen beantwoord zullen worden. Op basis van de gegevens die we zullen verkrijgen uit de eerste experimenten zal een inschatting gemaakt worden van de variatie en op basis daarvan de benodigde aantallen per studie bepaald.

Voor het geplande pilot experiment kunnen we wel gebruikmaken van de gedefinieerde functionele uitlees parameters. Voor de nier gaan we de functie uitlezen dmv glomerulaire filtratie snelheid (GFR). Deze wordt berekend uit de inuline klaring, wat tot nu toe wordt gezien als de gouden standaard meting voor nierfunctie. Omdat het uiteindelijke doel is PK studies uit te voeren in zieke organen willen we gezonde vs zieke nieren vergelijken. We gaan ziekte in de nier induceren door deze ex vivo te behandelen met een toxine of ischemie/reperfusie induceren. Voor zieke nieren gaan we uit van een GFR die 50% lager ligt dan de normale functie. Voor deze pilot houden we rekening met een standaard deviatie van 30%.

Met een alpha van 0.05 en een power van 0.8 komen we dan op een sample size van 6 dieren per groep (6 zieke en 6 gezonde nieren) om voor het pilot experiment om GFR verschillen te kunnen detecteren.

Omdat we lever en nier uit 1 dier halen is voor de lever geen aparte berekening gemaakt. Uit dit pilot experiment verkrijgen we informatie over de correlatie tussen de orgaan functie en de farmacokinetiek in dit orgaan. Dit stelt ons in staat om binnen 1 dier de klaringseffecten te koppelen aan functionele parameters, waardoor we voor vervolggexperimenten naar verwachting kunnen volstaan met 6 dieren per vraagstelling. Deze bevindingen zullen worden vergeleken met de humane data waardoor we ook een inschatting kunnen maken over de translationaliteit en de robuustheid van het model. De methode zal robuust genoeg moeten zijn om gezond en gradaties van ziekte te kunnen onderscheiden.

Daarnaast is het uiteindelijke doel om dit toe te passen in mens waarbij we ook variatie verwachten. Daarom zullen we altijd orgaan functie koppelen aan kinetiek. De data die nu in het varken wordt gegenereerd zal gebruikt worden om het humane materiaal zo efficiënt mogelijk te kunnen gebruiken en uiteindelijk zal ook de overstap worden gemaakt naar humaan materiaal.

Naar verwachting zijn 15 tot 20 experimenten met 6 varkens nodig voordat de volledige overstap naar humaan materiaal gemaakt kan worden. Uiteraard zal, indien we in de loop van het project voldoende kennis hebben opgedaan om de overstap naar humaan materiaal eerder te maken, de overstap eerder worden gemaakt.

Omdat de experimenten arbeids intensief zijn kunnen er maar max 2 dieren per maand worden ingezet (dus max 24 per jaar)=120 per 5 jaar.

Darmstudies zijn in het verleden al vaker uitgevoerd. Voor darm studies verwachten we 60 varkens nodig te hebben in een periode van 5 jaar (Omdat we met de huidige opzet 96 condities in 1 varken kunnen testen, waaronder regionale absorptie van stoffen, verschillende doseringen/formuleringen, is er veel vraag naar deze experimenten. We verwachten 1 varken per maand in te zetten voor deze doeleinden). We zullen altijd de nier/lever en darm experiment combineren.

B. De dieren

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

Diersoort en herkomst

Er zal voor deze studie gebruik gemaakt worden van volwassen SPF varkens. Afhankelijk van de vraag zal

gekozen worden voor varkens < 15 kg (minipigs), varkens van 15-60 kg of varkens > 60 kg. We hebben geen voorkeur voor bepaald geslacht en zullen gebruik maken van het dier dat op dat moment beschikbaar is.

Geschatte aantallen

Voor darm studies verwachten we 60 varkens nodig te hebben in een periode van 5 jaar (Omdat we met de huidige opzet 96 condities in 1 varken kunnen testen, waaronder regionale absorptie van stoffen, verschillende doseringen/formuleringen, is er veel vraag naar deze experimenten. We verwachten 1 varken per maand in te zetten voor deze doeleinden). Voor de lever en nier PK studie verwachten we max 120 dieren nodig te hebben. We streven er naar om darm en lever en nier studies zoveel mogelijk te combineren en zouden dan max 120 dieren nodig hebben in 5 jaar.

Onderbouwing diersoort

Wat betreft het translationele aspect en de vervolgstappen richting de mens verwachten we dat het gebruik van varkens materiaal een goede uitgangsbasis vormt voor het opzetten van de techniek, de grootte van de organen is vergelijkbaar, maar ook dat varkensmateriaal geschikt is om een voorspelling te kunnen doen voor de mens. Het maagdarm kanaal van het varken lijkt sterk op de van de mens en veel processen zijn vergelijkbaar, waardoor voor een groot aantal medicijnen de farmacokinetiek vergelijkbaar zal zijn met de mens. Er zijn echter uitzonderingen, zoals bijvoorbeeld beschreven door Dalgaard in 2015 (Comparison of minipig, dog, monkey and human drug metabolism and disposition, J. Pharmacol. Toxicol Methods, 2015), en hiermee zal dan ook rekening mee gehouden worden.

Herkomst: Alleen indien geen geschikt rest materiaal van een andere proef of slachthuismateriaal beschikbaar is, zal worden overgegaan tot het aankopen van een dier. De aangekochte varkens zijn afkomstig van een gecertificeerd SPF fokbedrijf.

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.

Gebruik maken van puur in vitro systemen is voor complexe organen nog niet mogelijk. Ook is er weinig humaan materiaal beschikbaar om ex vivo metingen op te doen. We willen uiteindelijk gebruik maken van humaan weefsel maar gebruiken als tussenstap het varken om de methode op te zetten en te valideren.

We dragen bij aan het verminderen en verfijnen van dierproeven doordat er in 1 varken meerdere condities worden bestudeerd, darm/lever en nier functie. Ook zullen we na isolatie van de organen de dieren en/of organen ter beschikking stellen voor overig kortdurend wetenschappelijk onderzoek dat onder terminale anesthesie plaats kan vinden.

Ten eerste wordt waar mogelijk gebruik gemaakt van materiaal afkomstig uit andere experimenten of van slachthuismateriaal. Dit zal van toepassing zijn voor pilot experimenten en voor de validatie studies. Voor

overige experimenten kan nu nog niet voorzien worden of dit mogelijk is. We streven ernaar om alleen ex vivo materiaal te gebruiken als duidelijk is dat de onderzoeksvraag op vers weefsel moet worden getest en dat slachthuis materiaal geen optie is. Aan het gebruik van materiaal afkomstig uit een andere proef of dieren die voor onderwijsdoeleinden zijn gebruikt zitten wel beperkingen. Dieren kunnen een ziekte historie hebben die niet samen gaat met onze vraagstelling. Dit kan tot gevolg hebben dat voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag geen gebruik gemaakt kan worden van dieren afkomstig uit andere proeven. Voor elke onderzoeksvraag zullen we in kaart brengen in welke tijdsperiode een dier nodig is voor de studie. Dit hangt o.a. af van de onderzoeksvragen die ons door onze klanten (universiteiten, overheid en business partners) worden voorgelegd). Wij inventariseren dan in eerste instantie of binnen het tijdbestek waarin de studie kan worden uitgevoerd, een dier beschikbaar komt uit onderwijs of ander onderzoek. Hiervoor hebben wij een netwerk opgezet van onderzoekers in Nederland die met varkens werken. We maken nu al gebruik van een bestaande samenwerking met 1 instellingsvergunninghouder waarbij organen gedeeld worden en daarnaast zullen we, daar waar mogelijk, samenwerkingen opzetten met andere instellingsvergunninghouders om zoveel mogelijk toegang te krijgen tot restmateriaal. We zullen actief meewerken aan een landelijk initiatief vanuit het platform IvDs om proefdiermateriaal te delen. Alleen indien geen restmateriaal beschikbaar is zal worden overgegaan tot het aankopen van een dier. Tevens zullen we vraagstellingen voor de verschillende organen combineren; we zullen dus nooit een dier opofferen en dan maar gebruik maken van 1 orgaan, maar altijd het beschikbare materiaal optimaal benutten. Factoren die hierbij een rol spelen zijn o.a. de werkzaamheid van de te testen stof en de hieraan gekoppelde uitleesparameters.

Tot slot werken we ook toe naar het opzetten van een vitale humane tissue supply chain, waarbij het de bedoeling is dat dit zelfde type onderzoek gedaan kan worden met humane weefsels (afval materiaal uit OKs en/of afgekeurde donororganen). Dit is nu nog niet gerealiseerd en daarom is de huidige aanvraag van belang om de ex vivo modellen op te zetten en te valideren.

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.

Dieren worden voorafgaand aan de proef 14 dagen geacclimatiseerd. Indien een test stof toegediend zal moeten worden zal dit in overleg met de betrokken IVD en dierenarts plaatsvinden om het ongerief tot het minimum te beperken. Overige handelingen zullen plaatsvinden onder terminale anesthesie.

We verwachten dat de te testen stoffen, die waarschijnlijk mede worden aangeleverd door de voedingsindustrie of de farmaceutische industrie, al zover ontwikkeld en onderzocht zijn dat deze geen nadelige effecten zullen hebben op het dier. Deze medicijnen of voedingsmiddelen/supplementen zullen al zover doorontwikkeld zijn dat ons model de stap is voordat de stoffen daadwerkelijk in klinische trials zullen worden getest, er zullen dus al veel eigenschappen van deze stof bekend zijn. Hoewel dit niet wordt verwacht, zal bij optreden van onbekende bijwerkingen die een negatieve invloed hebben op het welzijn van het dier de toediening direct worden gestopt.

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.

nvt

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

nvt

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

nvt

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.

Bij proeven waarbij alle handelingen plaatsvinden onder terminale anesthesie is de ongerief terminaal. Naar schatting is dit het grootste gedeelte van de experimenten (95%).

Bij proeven waarbij dieren vooraf behandeld worden met therapeutica of een microdosering van een tracer kan het ongerief licht zijn. We verwachten dat in maximaal 5% van de proeven een toediening voor nodig is. Bij orale toediening via het voer is geen ongerief te verwachten (1%). Bij het toediening van een oplaaddosis onder terminale anesthesie is ook geen extra ongerief te verwachten (2-3%). Als voor de oplaaddosis of microdosering een injectie of infusie nodig is die niet onder anesthesie kan plaatsvinden is het ongerief licht (1-2%).

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.

Organen worden geïsoleerd uit het dier

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast
Natuurwetenschappelijk Onderzoek)

Postbus 96800

2509 JE DEN HAAG



**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
AVD501002017888

Bijlagen

2

Datum 1 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 28 februari 2017. Het gaat om uw project "Bestuderen van functie e farmacokinetiek in organen (darm/lever/nier) voor wetenschappelijk onderzoek". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD501002017888. 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:

1 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD501002017888

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
1 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD501002017888

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 50100
Naam instelling of organisatie: TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast
Natuurwetenschappelijk Onderzoek)
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 27376655
Postbus: 96800
Postcode en plaats: 2509 JE DEN HAAG
IBAN: NL39INGB0657819271
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: TNO

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
1 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD501002017888

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 januari 2018
Geplande einddatum: 31 december 2023
Titel project: Bestuderen van functie e farmacokinetiek in organen (darm/lever/nier) voor wetenschappelijk onderzoek
Titel niet-technische samenvatting: Bestuderen van functie en farmacokinetiek in organen (darm/lever/nier) voor wetenschappelijk onderzoek
Naam DEC: DEC-TNO
Postadres DEC: 96800 2509 JE DEN HAAG
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Den Haag
Datum: 28 februari 2017

Datum:
1 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD501002017888



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO (Nederlandse Organisatie voor Toegepast
Natuurwetenschappelijk Onderzoek)

Postbus 96800

2509 JE DEN HAAG



**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
AVD501002017888

Bijlagen

2

Datum 1 maart 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 1 maart 2017

Vervaldatum: 31 maart 2017

Factuurnummer: 170888

Ordernummer: 3100159571/1

| Omschrijving | Bedrag |
|----------------------------------------------------------------------------------|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD501002017888 | € 1035,- |

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

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:
2. Titel van het project: **Bestuderen van functie en farmacokinetiek in organen (darm/lever/nier) voor wetenschappelijk onderzoek**
3. Titel van de NTS: **Bestuderen van functie en farmacokinetiek in organen (darm/lever/nier) voor wetenschappelijk onderzoek**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: **DEC TNO**
 - telefoonnummer contactpersoon: ██████████
 - e-mailadres contactpersoon: ██████████
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - X ontvangen door DEC: **14-12-2016**
 - X aanvraag compleet: **14-12-2016**
 - X in vergadering besproken: **21-12-2016**
 - X anderszins behandeld: **schriftelijke vragen voorgelegd aan indiener**
 - x termijnonderbreking(en) **van 22-12-16 tot 8-2-17 en van 20-2-17 tot 22-2-17**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - x aanpassing aanvraag: **8-2-17 en 22-2-17**
 - x advies aan CCD: **28-2-2017**
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD. **De aanvraag is afgestemd met de IvD en heeft instemming van de IvD.**

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrondinformatie etc.) kan bij punten 8 en 9 worden volstaan met de vermelding van het type vragen en de vermelding dat de aanvraag op de desbetreffende onderdelen is aangepast of dat de antwoorden in de aanvraag zijn verwerkt. Bij vragen die gericht zijn op het verkrijgen van verklaringen voor keuzes die door de aanvrager gemaakt worden, kan niet worden volstaan met het weergeven van de strekking van de antwoorden tenzij de antwoorden volledig in de aanvraag zijn opgenomen. Als dat het geval is, moet dat in het DEC-advies worden benoemd en in de aanvraag inzichtelijk worden gemaakt.

8. Eventueel horen van aanvrager: **n.v.t.**
- Datum
 - Plaats
 - Aantal aanwezige DEC-leden
 - Aanwezige (namens) aanvrager
 - Gestelde vraag / vragen
 - Verstrek(e) antwoord(en)
 - Het horen van de aanvrager heeft wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **22-12-2016**
- Gestelde vraag/vragen

- 1. Het doel van dit onderzoek is voor ons niet helemaal helder. Specifiek bij 3.1 lijkt het onderzoek gericht op diabetes type 2, terwijl elders in het projectvoorstel de toepassingsmogelijkheden voor metabole complicaties veel breder lijken zijn. Kunt u duidelijk maken – consequent op verschillende plaatsen in het voorstel – wat het doel van dit project is en, indien er meerdere doelen zijn, hoe deze zich tot elkaar verhouden?**
- 2. Om een goede afweging te kunnen maken hebben wij meer informatie nodig over de haalbaarheid van het onderzoek. Ten eerste (2a) verzoeken wij u om de onderzoeksgroep te beschrijven, in relatie tot dit onderzoek. Het is hierbij niet nodig om namen of referenties te geven. Beschrijf ook de ervaring van de onderzoeksgroep met dit type onderzoek, zodat wij de haalbaarheid van de beschreven doelen kunnen inschatten. Ten tweede (2b) verzoeken wij u wat meer te vertellen over de vervolgstappen richting onderzoek met mensen of menselijk materiaal. Hoe verhouden deze onderzoeken zich tot het beschreven onderzoek? Kunt u wat meer vertellen over de interactie?**
- 3. De strategie waarmee u denkt de doelen te bereiken is voor ons niet helemaal helder. Bij 3.4, Onderzoeksstrategie, vragen wij ons af: hoe bepaalt u welke experimenten en validatie-experimenten u met darm en met lever en nier moet uitvoeren? Welke informatie uit bijvoorbeeld literatuur of experimenten op slachtmateriaal geven aan dat een experiment op ex-vivo-materiaal nodig is? Hoe bepaalt u vervolgens welke stoffen, drugs of externe factoren u moet onderzoeken?**
- 4. Daarmee samenhangend bij 3.4 of bij D van de bijlagen: wat is uw strategie om het aantal proefdieren te minimaliseren? Welke strategieën past u toe om de verschillende onderzoeksvragen dusdanig te prioriteren zodat u het ex-vivo-materiaal optimaal kunt gebruiken? Wat zijn hierbij de factoren die bepalen dat wachten op het beschikbaar komen van ex-vivo-materiaal niet mogelijk is, en dat een dier besteld moet worden?**
- 5. Om een goede afweging te kunnen maken is het nodig om goed te begrijpen hoe u aan de aantallen dieren komt die u aanvraagt. Dit is niet voldoende helder voor ons. Gebruik bij het verhelderen uw beschreven onderzoeksstrategie. Specificeer de alinea waarin u het aantal studies per jaar beschrijft. Daarnaast hebben wij gediscussieerd over hoe de factor dier een rol speelt in uw**

experimenten. U beschrijft dat u uiteindelijk naar experimenten wilt gaan waarbij maar 1 dier nodig is. Hoe borgt u in deze experimenten dat de variatie tussen dieren, en derhalve ook van het biologisch materiaal dat u gebruikt van dieren, geen systematische fout zal veroorzaken in uw experimenten? Is het niet altijd nodig om de factor dier mee te blijven nemen? Wellicht kunt u op basis van uw ervaring en historische data hierop ingaan.

- 6. In relatie hiermee: hoe borgt u, wellicht in samenwerking met de IvD, dat bij elk experiment alle benodigde stappen zijn nageleefd die ervoor zorgen dat er zo min mogelijk nieuwe dieren gebruikt hoeven te worden? Hierbij denken wij ook aan het gebruik van uw netwerk en samenwerkingsverbanden (welke?), en hoe deze keer op keer, per experiment, geraadpleegd zullen worden. Betrek in deze beschrijving zo nodig ook of in de experimenten het type varken een rol speelt.**
- 7. Om het ongerief goed te kunnen in schatten, vragen wij ons af welke typen stoffen er gebruikt zullen worden bij de experimenten waarbij de dieren vooraf behandeld worden. Hoe wordt geborgd dat het ongerief dat de dieren ondervinden niet meer dan licht zal zijn door eigenschappen van de stof (bijvoorbeeld irriterende stoffen)?**

- Datum antwoord: **8-2-2017**

- Verstrekt(e) antwoord(en)

- 1. Het doel van het project is om farmacokinetiek te bestuderen in zieke organen, waarbij de focus van het project ligt op ziekte veroorzaakt door metabool syndroom, een van de metabole complicaties is diabetes type 2. Bij metabool syndroom zijn de organen die betrokken zijn bij het klaren en omzetten van stoffen vaak aangedaan waardoor de handeling van stoffen zoals medicijnen verstoord is. Deze verstoring willen we bestuderen. Om verwarring te voorkomen is de omschrijving van diabetes type 2 uit het project voorstel gehaald. De beschrijving van achtergrond en doel zijn hiermee in lijn gebracht met het doel zoals hierboven beschreven. Alinea 3.1 is aangepast om de leesbaarheid te verbeteren en de doelstelling beter te omschrijven.**
- 2. 2a. Dit project heeft een hoge haalbaarheid doordat de betrokken onderzoeksgroepen veel expertise hebben op het gebied van farmacokinetiek en metabole ziekten. De onderzoeksgroepen hebben een brede expertise op het gebied van voorspellen en moduleren van kinetiek van oa voedingsstoffen en medicijnen in gezondheid en ziekte. De onderzoeksgroep bestaat uit onderzoekers met ruime ervaring in het bestuderen van farmacokinetiek in zowel in vivo en in vitro settings en onderzoekers die ervaring hebben met het bestuderen van metabole complicaties in vivo, waaronder leveraandoening en nierfalen. Afgelopen jaren is gewerkt aan het opzetten van een ex vivo darmmodel waarbij oa gebruik werd gemaakt van rest materiaal van varkens. De kennis hiervan wordt ook toegepast bij de praktische problemen die we tegenkomen bij de andere organen. Door deze kennis van meerdere onderzoeksgroepen binnen het instituut te combineren kunnen we optimaal gebruik maken van de aanwezig expertise binnen de onderzoeksgroepen.**

Ook zijn er veel (inter)nationale samenwerkingen waarbinnen de proefopzet en resultaten zullen worden getoetst. Dit is ook weergegeven bij 3.2

2b. Voor toepassing op humaan materiaal zijn we bezig om een vitale human tissue supply chain op te zetten. Om gebruik te kunnen maken van resectiemateriaal uit OKs en/of afgekeurd donormateriaal hebben we contact gehad met eurotransplant en de nederlandse transplantatie stichting en inzicht gekregen in de routes die gebruikt kunnen worden om deze weefsels in te zetten voor deze wetenschappelijke doeleinden. Dit is ook aangegeven in 3.4.1.

Voor vervolgstappen richting de mens zullen we gebruik maken van onze eigen praktische kennis die we op willen doen in dit project. Vice versa maken we in het huidige project ook veel gebruik van kennis beschikbaar uit de transplantatie wereld. Voor de lever hebben we hiervoor contact met oa UMC Groningen en voor de nier met UMC Utrecht, en daarnaast met OrganAssist, de leverancier van de ex vivo perfusie systemen, die veel ervaring hebben op dit gebied. Wat betreft het translationele aspect en de vervolgstappen richting de mens verwachten we dat het gebruik van varkens materiaal een goede uitgangsbasis vormt voor het opzetten van de techniek, de grootte van de organen is vergelijkbaar, maar ook dat varkensmateriaal geschikt is om een voorspelling te kunnen doen voor de mens. Het maagdarm kanaal van het varken lijkt sterk op de van de mens en veel processen zijn vergelijkbaar, waardoor voor een groot aantal medicijnen de farmacokinetiek vergelijkbaar zal zijn met de mens. Er zijn echter uitzonderingen, zoals bijvoorbeeld beschreven door Dalgaard in 2015

(Comparison of minipig, dog, monkey and human drug metabolism and disposition, J. Pharmacol. Toxicol Methods, 2015), en hiermee zal dan ook rekening mee gehouden worden. Dit is ook aangegeven in 3.4.1.

3. Het bepalen welke validatie experimenten uitgevoerd moeten worden doen we aan de hand van literatuur. Voor de darm weten we al welke ex vivo condities nodig zijn om stukje weefsel van het orgaan in leven te kunnen houden en de functie te bestuderen. We hebben inmiddels veel inzichten gekregen in hoe we de absorptie van stoffen kunnen bestuderen in het ex vivo model (en dit ook vergeleken met literatuur – validatie (Westerhout et al, A new approach to predict human intestinal absorption using porcine intestinal tissue and biorelevant matrices, Eur J Pharm Sci, 2014.). Experimenten en validatie experimenten die met de darm uitgevoerd moeten worden:

Validatie: bestuderen van farmacokinetiek van bekende stof (medicijn) in verschillende compartimenten van de darm en dit vergelijken met literatuur/humane data.

Experimenten die hierop volgen zullen gericht zijn op het bestuderen van farmacokinetiek van onbekendere stoffen (therapeutische eiwitten/peptides/biologics), dit zal vaak in samenwerking met een voedingsbedrijf of de farmaceutische industrie gedaan worden, waarbij de nadruk altijd zal liggen op het verbeteren van gezondheid van de mens.

Informatie die nodig is uit literatuur of experimenten op slachthuis materiaal die aangeven dat een ex-vivo experiment nodig is is onder andere kennis over waar in het orgaan de stof/medicijn

wordt verwerkt. Bij bijvoorbeeld het bestuderen van de invloed van de samenstelling van de darmmucosa is vers materiaal van belang. Voor de darm is dit bij 3.4.1 stapsgewijs beschreven: Voor darm:

- 1). Verder bouwen aan bestaande methodologische kennis mbv ex vivo experimenten om zo meer kennis te genereren of (dys)functie van de verschillende compartimenten van de darm in dierlijk weefsel**
- 2). Validatie van deze kennis door het bestuderen van farmacokinetiek van een bekende stof in verschillende compartimenten van de darm.**
- 3). Deze kennis en resultaten toetsen aan humane literatuur**
- 4). Testen van experimentele onbekende stoffen (voedingsstoffen/medicijnen) in ex vivo setup met varkensmateriaal verkregen uit slachthuismateriaal of, indien noodzakelijk, uit voor proef opgeofferd dier.**
- 5). Verder opzetten toegang tot humaan weefsel**
- 6). Opgebouwde methodologische en inhoudelijke kennis toetsen en toepassen op humaan materiaal**

Voor de nier en lever weten we uit de literatuur dat het mogelijk is om de organen voor een bepaalde periode (ongeveer 6 uur) ex vivo in leven te kunnen houden. Dit moeten we eerst zelf ook praktisch kunnen uitvoeren. We maken hierbij veel gebruik van de bestaande kennis uit het transplantatie veld, we zijn op bezoek geweest bij een groep in Leicester waar ook ex vivo lever en nier experimenten worden gedaan, maar moeten dit nog wel zelf verder opzetten. Hiervoor zijn pilot experimenten nodig.

Experimenten en validatie experimenten die met de lever en de nier uitgevoerd moeten worden:

Opzetten technisch protocol, waarbij levensduur en functie de belangrijkste uitleesparameters zullen zijn. Voor functie is bij de lever is oa galproductie, bloedgaspH, glucose en lactaat een standaard uitlezing (in transplantatie setting). Voor de nier is dit oa klaring (inuline,PAH, creatinine), natrium en kalium excretie en eventueel glucose.

Als we dit praktisch in de vingers hebben dan moet er gekeken worden hoe de ex-vivo organen omgaan (o.a. omzetten en excretie) met bepaalde stoffen/medicijnen waarvan bekend is hoe deze in de mens worden verwerkt in vivo (validatie-experimenten).Dit zal vergeleken worden met de literatuur en humane data.

We verwachten hierbij dat de varkens organen hierin weinig verschillen met de mens en dat de resultaten overeen zullen komen met de gegevens bekend uit literatuur. Als we dit hebben kunnen bevestigen dan zullen ook experimentele studies uitgevoerd worden waarbij medicijnen zullen worden getest die zich nog in de ontwikkelingsfase bevinden, dit zal in samenwerking met oa farmaceutische industrie worden gedaan. Ook hierbij zal de nadruk altijd zal liggen op het verbeteren van gezondheid van de mens.

De keuze om gebruik te maken van slachthuismateriaal of ex-vivo (vers) materiaal zal samenhangen met de kennis over de stof en het type orgaan. Voor lever en nier zal voor het technische opzetten zeker gekozen worden voor restmateriaal van andere proef of slachthuis, voor experimentele vragen zal dit per te testen stof of vraagstelling bekeken moeten worden. Deze stappen zijn ook in 3.4 stapsgewijs beschreven:

1). opzetten mogelijkheid om ex vivo nier en lever functie en farmacokinetiek te kunnen bestuderen in dierlijk weefsel. Hierbij zal gekeken worden naar functionele parameters, als die vergelijkbaar zijn met gegevens bekend uit de transplantatie wereld kunnen we ook farmacokinetische studies uitvoeren in een werkend orgaan.

2). Uitvoeren van validatie studies in dierlijk weefsel waarin klaring van een bekende stof wordt getest ex vivo. 3). Validatie experimenten vergelijken met bekende literatuur en humane data

4). Testen van experimentele onbekende stoffen (voedingsstoffen/medicijnen) in ex vivo setup met varkensmateriaal verkregen uit slachthuismateriaal of, indien noodzakelijk, uit voor proef opgeofferd dier. 5). Opgebouwde methodologie en inhoudelijke kennis toetsen en toepassen op humaan materiaal.

4.

Ten eerste proberen zo veel mogelijk gebruik te maken van materiaal afkomstig uit andere experimenten of van slachthuismateriaal. Dit zal van toepassing zijn voor pilot experimenten en voor de validatie studies. Voor overige experimenten kan nu nog niet voorzien worden of dit mogelijk is. We streven ernaar om ex vivo materiaal te gebruiken als duidelijk is dat de onderzoeksvraag op vers weefsel moet worden getest en dat slachthuismateriaal geen optie is. Aan het gebruik van materiaal afkomstig uit een andere proef of dieren die voor onderwijsdoeleinden zijn gebruikt zitten wel beperkingen. Dieren kunnen een ziekte historie hebben die niet samen gaat met onze vraagstelling. Dit kan tot gevolg hebben dat voor het beantwoorden van de onderzoeksvraag geen gebruik gemaakt kan worden van dieren afkomstig uit andere proeven. Voor elke onderzoeksvraag zullen we in kaart brengen in welke tijdsperiode een dier nodig is voor de studie. Dit hangt o.a. af van de onderzoeksvragen die ons door onze klanten (universiteiten, overheid en business partners) worden voorgelegd). Wij inventariseren dan in eerste instantie of binnen het tijdbestek waarin de studie kan worden uitgevoerd, een dier beschikbaar komt uit onderwijs of ander onderzoek. Hiervoor hebben wij een netwerk opgezet van onderzoekers in Nederland die met varkens werken. Alleen indien dit niet het geval is, zal worden overgegaan tot het aankopen van een dier. Ook zullen we altijd proberen om dit te combineren met vraagstellingen voor andere organen; we zullen dus nooit een dier opofferen en dan maar gebruik maken van 1 orgaan, maar altijd het beschikbare materiaal optimaal benutten. Factoren die hierbij een rol spelen zijn oa de werkzaamheid van de te testen stof en de hieraan gekoppelde uitleesparameters.

Daarnaast is het zo dat er bijvoorbeeld voor de darm studies wel 96 verschillende condities getest kunnen worden op darmweefsel van 1 dier, omdat het weefsel over verschillende vials wordt verdeeld. Tot slot werken we ook toe naar het opzetten van een vitale humane tissue supply chain, waarbij het de bedoeling is dat dit zelfde type onderzoek gedaan kan worden met humane weefsels (afval materiaal uit OKs en/of afgekeurde donororganen). Dit is nu nog niet gerealiseerd en daarom is de huidige aanvraag van belang om de ex vivo modellen op te zetten en te valideren. Dit is weergegeven in de D van de bijlage.

5. Voor de darm wordt er ongeveer 10-12 studies per jaar uitgevoerd, dit aantal is bekend uit voorafgaande jaren.

Aan de hand van de onderzoeksstrategie is het aantal dieren nogmaals aangegeven.

Voor darm:

Verder bouwen aan bestaande methodologische, fysiologische en farmacokinetische kennis mbv ex vivo experimenten om zo meer kennis te genereren of (dys)functie van de verschillende compartimenten van de darm in dierlijk weefsel. Dit zal gecombineerd worden met experimentele studies. Hiervan weten we dat er 10-12 dieren per jaar, 60 in 5 jaar gebruikt kunnen worden.

Voor de nier gaan we de functie uitlezen dmv glomerulaire filtratie snelheid (GFR). Deze wordt berekend uit de inuline klaring, wat tot nu toe wordt gezien als de gouden standaard meting voor nierfunctie. Omdat het uiteindelijk doel is PK studies uit te voeren in zieke organen willen we gezonde vs zieke nieren vergelijken. We gaan ziekte in de nier induceren door deze ex vivo te behandelen met een toxine of ischemie/reperfusie induceren. Voor zieke nieren gaan we uit van een GFR die 50% lager ligt dan de normale functie. Voor deze pilot houden we rekening met een standaard deviatie van 30%.

Met een alpha van 0.05 en een power van 0.8 komen we dan op een sample size van 6 dieren om voor het pilot experiment om GFR verschillen te kunnen detecteren. We willen het effect in zowel een gezonde als zieke omgeving bestuderen. Om effect te kunnen zien in een zieke omgeving komt men op een aantal van 6 dieren uit (6 gezond vs 6 ziek). Wij willen er echter uiteindelijk naar toe om in 1 nier eerst de klaring van de stof in de gezonde situatie bestuderen ex vivo, daarna ex vivo schade induceren en vervolgens in diezelfde kapotte nier nogmaals de klaring bestuderen. We hopen daarbij dat de diervariatie uitermate klein is dat er met een minimum aantal dieren gewerkt kan worden. Aan de hand van de onderzoeksstrategie is het aantal dieren nogmaals aangegeven.

Voor lever en nier:

1).opzetten mogelijkheid om ex vivo nier en lever functie en farmacokinetiek te kunnen bestuderen in dierlijk weefsel. Hierbij zal gekeken worden naar functionele parameters, als die vergelijkbaar zijn met gegevens bekend uit de transplantatie wereld kunnen we ook farmacokinetische studies uitvoeren in een werkend orgaan. Dit zal gecombineerd worden met 2). Uitvoeren van validatie studies in dierlijk weefsel waarin klaring van een bekende stof wordt getest ex vivo.

In de pilot (1+2), willen we het effect van een bekende stof vergelijken in een zieke vs een gezonde omgeving. We komen dan uit op 6 vs 6 dieren. Uit deze proef moet ook blijken hoe groot de variatie tussen de dieren onderling is en kunnen we in beeld brengen wat de correlatie orgaan-functie/farmacokinetiek is. Theoretisch zouden we voor alle validatie en experimentele studies gebruik kunnen maken van 6 vs 6 dieren. We verwachten echter dat de correlatie functie/farmacokinetiek erg sterk is. Daarnaast willen we in het orgaan van 1 dier eerst meten in het gezonde orgaan, daarna schade induceren en in hetzelfde orgaan nogmaals meten. Hierdoor kunnen we binnen 1 dier twee situaties na bootsen. Er zouden dan per studie 6 dieren nodig zijn. Bij 10 studies per jaar zou dit uitkomen op 60 dieren per jaar en 300 per

5 jaar. Vanwege de looptijd van 1 experiment en de bijbehorende voorbereidingen en uitwerkingen, wordt geschat dat er per jaar gemiddeld 12 experimenten uitgevoerd kunnen worden. Om de vervolgvragen te kunnen beantwoorden: (4). Testen van experimentele onbekende stoffen (voedingsstoffen/medicijnen) in ex vivo setup met varkensmateriaal verkregen uit slachthuismateriaal of, indien noodzakelijk, uit voor proef opgeofferd dier) zal de farmacokinetiek altijd worden gekoppeld aan functie, waardoor er een uitspraak gedaan kan worden over deze relatie. Als deze koppeling heel duidelijk is zal dit ook in de humane situatie worden bestudeerd.

De darm en lever/nier experimenten zullen zoveel mogelijk gecombineerd worden. We verwachten dus een maximaal aantal van 120 + 12 dieren te gebruiken.

Factor dier: We realiseren ons dat er variatie tussen de dieren bestaat en willen ook in de pilot fase in beeld brengen hoe groot de variatie is in de gezonde en zieke situatie. We verwachten echter dat we altijd in staat zullen zijn om de klaringseffecten te koppelen aan functionele parameters en zo toch in staat zullen zijn om al door 1 dier te gebruiken een uitspraak te kunnen doen. Deze bevindingen zullen worden vergeleken met de humane data waardoor we ook een inschatting kunnen maken over de translationaliteit en de robuustheid van het model. De methode zal robuust genoeg moeten zijn om gezond en gradaties van ziekte te kunnen onderscheiden. Daarnaast is het uiteindelijke doel om dit toe te passen in mens waarbij we ook variatie verwachten. Daarom zullen we altijd orgaan functie koppelen aan kinetiek. De data die nu in het varken wordt gegenereerd zal gebruikt worden om het humane materiaal zo efficiënt mogelijk te kunnen gebruiken en uiteindelijk zal ook de overstap worden gemaakt naar humaan materiaal. Dit is ook weergegeven in D in de bijlage.

- 6. Voorafgaand aan het experiment zal worden geïnventariseerd welk type materiaal nodig is en waar dit beschikbaar is. Ten eerste proberen zo veel mogelijk gebruik te maken van materiaal afkomstig uit andere experimenten of van slachthuismateriaal. Voor elke onderzoeksvraag zullen we in kaart brengen in welke tijdsperiode een dier nodig is voor de studie. Dit hangt o.a. af van de onderzoeksvragen die ons door onze klanten (universiteiten, overheid en business partners) worden voorgelegd). Wij inventariseren dan in eerste instantie of binnen het tijdbestek waarin de studie kan worden uitgevoerd, een dier beschikbaar komt uit onderwijs of ander onderzoek. Hiervoor hebben wij een netwerk opgezet van onderzoekers in Nederland die met varkens werken. In Nederland zijn initiatieven opgezet waarbij de vergunningsinstellingen aan het inventariseren zijn welke proeven er plaatsvinden en welk restmateriaal beschikbaar is voor onderzoek. We hebben aangegeven dat we hier in mee willen doen en belangstelling hebben voor het gebruik van restmateriaal. Momenteel gaat dit vnl via de UU en het UMC Utrecht, mede om logistieke redenen (het materiaal moet zo snel mogelijk naar TNO Zeist vervoerd worden, langere reistijd heeft effect op de vitaliteit en daarmee de bruikbaarheid van het orgaan). Wel zullen we gebruik maken van de kennis uit de transplantatie wereld om dit proces te verbeteren waardoor we ook gebruik zouden kunnen maken van organen die een langere reistijd hebben. Alleen geen andere opties beschikbaar zijn, zal worden overgegaan tot het**

aankopen van een dier. Ook zullen we altijd proberen om dit te combineren met vraagstellingen voor andere organen; we zullen dus nooit een dier opofferen en dan maar gebruik maken van 1 orgaan, maar altijd het beschikbare materiaal optimaal benutten. Het type varken speelt hierbij wel een rol. Voor darm experimenten kan gebruik gemaakt worden van bijna alle typen varken (afhankelijk van de vraagstelling). Voor de lever en nier perfusie experimenten is het nu nog niet mogelijk om gebruik te maken van bijv minipigs om de perfusie systemen zijn ontworpen voor humane organen en dus ook alle aansluitingen zo zijn gemaakt dat ze alleen passen op organen van vergelijkbare grootte (varken van minimaal 60 kilo). Als aansluitingen aangepast zouden kunnen worden kunnen we ook gebruik maken van kleiner materiaal. Dit is iets wat samen met de perfusie partner, OrganAssist, uitgezocht moet worden. Dit is ook weergegeven in B van de bijlage.

- 7. We verwachten dat de te testen stoffen, die waarschijnlijk mede worden aangeleverd door de voedingsindustrie of de farmaceutische industrie, al zover ontwikkeld en onderzocht zijn dat deze geen nadelige effecten zullen hebben op het dier. Deze medicijnen of voedingsmiddelen/supplementen zullen al zover doorontwikkeld zijn dat ons model de stap is voordat de stoffen daadwerkelijk in klinische trials zullen worden getest, er zullen dus al veel eigenschappen van deze stof bekend zijn. Hoewel dit niet wordt verwacht, zal bij optreden van onbekende bijwerkingen die een negatieve invloed hebben op het welzijn van het dier de toediening direct worden gestopt. Dit is ook weergegeven in bijlage D.**

- De antwoorden hebben **wel** geleid tot aanpassing van de aanvraag

- Datum: **20-2-2017**

- Gestelde vraag/vragen

Naar onze mening zijn de vragen adequaat beantwoord. We vinden echter dat de verwerking in het projectvoorstel geen recht doet aan de kwaliteit van de antwoorden. Dit omdat de antwoorden niet altijd op meest passende plaats in de vergunningaanvraag zijn geplaatst. Ook zijn er nog te veel vaagheden en inconsequenties. We verwachten bijvoorbeeld dat het gebruik van alternatieven met meer stelligheid vastgesteld wordt (geen termen als "intentie" en "proberen"). De NTS strookt niet overal met de overige documenten, bijvoorbeeld wat betreft de benodigde aantallen dieren. Wanneer deze punten in acht worden genomen, staan wij positief tegenover het projectvoorstel. Wij verzoeken u een verbeterde versie aan te leveren, waarna wij, na een schriftelijke consultatie van alle leden, tot een advies over zullen gaan.

- Antwoord:

Dank u voor uw positieve reactie. Naar aanleiding van uw opmerkingen hebben wij de antwoorden op de vragen zodanig in de projectaanvraag ingepast, dat de opbouw logisch is. Tevens hebben wij vaagheden mbt gebruik van alternatieven met meer stelligheid omschreven.

Ten aanzien van de aantallen dieren, realiseren wij ons nu dat wij in onze eerdere beantwoording inconsequent hebben doorgerekend, wat heeft geleid tot een discrepantie tussen de NTS en de overige documenten.

De berekening voor het maximaal aantal te gebruiken dieren is hieronder daarom nogmaals samengevat:

Voor de berekening van het aantal benodigde dieren wordt uitgegaan van de berekening van dieren, nodig voor lever en nier onderzoek. Het benodigde darmweefsel wordt uit dezelfde dieren gehaald, waardoor voor dit deel van het onderzoek geen extra dieren nodig zijn.

Voor lever en nieronderzoek zijn voor een eerste pilot 12 dieren nodig (zie onderbouwing in de aanvraag). Voor het beantwoorden van vervolgvragen zijn 6 varkens per experiment nodig (zie onderbouwing in de aanvraag). Naar verwachting zijn 15 tot 20 experimenten met 6 varkens nodig voordat de volledige overstap naar humaan materiaal gemaakt kan worden. Omdat de experimenten arbeidsintensief zijn kunnen er maar max 2 dieren per maand worden ingezet (dus max 24 per jaar)=120 per 5 jaar.

Uiteraard zal, indien we in de loop van het project voldoende kennis hebben opgedaan om de overstap naar humaan materiaal eerder te maken, de overstap eerder worden gemaakt.

Bij onderdeel A in de Bijlage is bovenstaande verduidelijkt waar nodig.

De NTS is hiermee weer in lijn met de aanvraag. Tevens hebben wij, op advies van de IvD, de NTS in eenvoudiger bewoordingen beschreven.

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

- Aard expertise: **n.v.t.**
- Deskundigheid expert: **n.v.t.**
- Datum verzoek: **n.v.t.**
- Strekking van het verzoek: **n.v.t.**
- Datum expert advies: **n.v.t.**
- Advies expert: **n.v.t.**

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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, het is vergunningplichtig. Voor het bestuderen van functie en farmacokinetiek in organen (darm/lever/nier) voor wetenschappelijk onderzoek krijgen varkens stoffen toegediend en worden de dieren doodgemaakt om het de organen te bestuderen, dit betreft dierproeven in de zin der wet.**

Hier is geen discussie over geweest.

Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.

1. De aanvraag betreft een **nieuwe** aanvraag.
2. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja, de DEC is competent om hierover te adviseren.**
3. 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. **Er zijn geen DEC-leden uitgesloten. Daar was geen aanleiding toe.**

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*). **Ja, dit is naar ons idee een toetsbare aanvraag met voldoende samenhang. Het combineren van functie en farmacokinetiek van stoffen in lever, nier en darm in een projectaanvraag biedt de mogelijkheid om kennis en materiaal optimaal te benutten. Het betreft meerdere dierproeven met een vergelijkbaar doel en een vergelijkbare opzet. Het onderzoek is in een context geplaatst van in vitro en ex vivo onderzoek op slachthuismateriaal, waarbij duidelijk is gemaakt wanneer proefdieren noodzakelijk zijn en welke strategieën worden toegepast om de verschillende stappen te zetten.**
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 Wet Natuurbescherming). **Er is bij ons geen tegenstrijdige wetgeving bekend die van toepassing zou zijn.**
3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelestellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. **De DEC onderschrijft dat dit project zowel fundamenteel onderzoek als translationeel of toegepast onderzoek kan betreffen.**

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 doel van het onderzoek is het bestuderen van functie, kinetiek en metabolisme van stoffen in een geïsoleerd orgaan. Het gaat hierbij specifiek om first-pass organen zoals darm, lever en nier. Dit zal in preklinische setting plaatsvinden om de methode op te zetten en te valideren. Het achterliggende doel is om de verworven kennis uiteindelijk toe te passen op humaan materiaal. De onderzoeker heeft in de beschrijving voldoende duidelijk gemaakt dat de doelstelling in de beschreven setting haalbaar is en dat translatie naar relevante informatie voor de mens een goede kans van slagen heeft. De DEC vindt onderzoek doen naar bovenstaande doelen essentieel omdat op deze manier de verschuiving naar meetmethoden met hoge translatiewaarde en minimaal diergebruik mogelijk worden gemaakt.**
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 zijn grote aantallen darm-, lever-, en nierpatiënten, en maximaal 120 varkens die gebruikt worden als proefdier. Voor de patiënten gaat het om een betere kwaliteit van leven door goed werkende therapieën en vermindering van bijwerkingen. Voor de varkens gaat het om hun leven en soms licht ongerief door bijvoorbeeld een naaldprik. Daarnaast heeft de maatschappij als geheel belang bij deze experimenten. Goed voorspelbare modellen zullen leiden naar een kortere ontwikkelingstijd van medicijnen, wat kan leiden tot goedkopere medicatie. Ook proefdieren in het algemeen hebben een belang. Ex vivo experimenten**

met restmateriaal of slachthuismateriaal kunnen leiden tot vermindering van het aantal dierproeven. Betere voorspelbare modellen kunnen bijdragen aan verfijning en vermindering van dierproeven.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken? **Nee.**

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*). **De onderzoeksgroep geeft blijk van voldoende kennis en ervaring op het gebied van farmacokinetiek en metabole ziekten. De aanvrager geeft bovendien aan nauw in contact te staan met andere deskundigen. Bovendien geeft de aanvrager blijk van samenwerking en kennisdeling binnen en buiten het instituut.**
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 haalbaarheid is voldoende beargumenteerd door de aanwezige expertise en interne en externe samenwerking. Ook geeft de aanvrager dat de onderzoeksgroep ruime ervaring heeft met het opzetten van een ex vivo model. De beschreven strategie geeft de DEC voldoende informatie om te verwachten dat er haalbare doelen zijn gesteld, juist ook omdat er voor de verschillende studies verschillende stadia van onderzoek zijn beschreven met voor de IvD goed toetsbare go/no-go-momenten.**

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*). **De varkens zijn niet gefokt als proefdier. Bij de diersoort varken past dit binnen de richtlijn.**

- 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 dieren worden volgens de richtlijn gehuisvest en verzorgd.**

- 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*). **Het cumulatieve ongerief is naar het idee van de DEC goed ingeschat. Een klein aantal dieren krijgt eenmalig een injectie. Het merendeel krijgt terminale anesthesie.**
- 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*). **Dieren worden beperkt in hun autonomie doordat zij zonder dat zij daar voordeel van hebben stoffen toegediend krijgen en doordat zij gedood worden.**
- 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*). **N.v.t.**

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 onderzoeker maakt duidelijk dat er geen alternatieven zijn voor complexe organen als nier, darm en lever. Ook is er weinig humaan materiaal beschikbaar om ex vivo metingen op te doen. De DEC onderschrijft beide beperkingen en ziet het gebruik van het varken als een noodzakelijke tussenstap om voortgang te boeken in het onderzoek naar functie, kinetiek en metabolisme van stoffen in een geïsoleerd orgaan.**
- 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*). **Na verhelderende antwoorden op vraag 5 en een latere aanpassing is de strategie voor het te berekenen aantal dieren voor de DEC helder. De DEC benadrukt ook dat de onderzoeker oog heeft voor het optimaal benutten van het dierlijk materiaal. Het onderzoek draagt bij aan vermindering en maakt gebruik van slachtafval en restmateriaal waar mogelijk. Ook levert het onderzoek restmateriaal aan andere onderzoekers. Hiervoor is een goed netwerk aanwezig.**
- 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 is van mening dat het project in overeenstemming is met de vereisten ten aanzien van de verfijning van dierproeven. Het effect van de stof in het lichaam wordt niet in vivo bekeken in het hele dier (wat ongerief kan veroorzaken), maar in het orgaan van een dier onder terminale anesthesie (grootste deel). Het doden van de varkens is noodzakelijk voor het behalen van de doelen. Het dier komt niet meer bij, waardoor het ongerief bij de meeste dieren terminaal blijft. Bij een klein deel wordt een injectie gegeven op de best mogelijke manier.**
- 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. **N.v.t.**

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*). **Qua geslacht wordt gekeken welke dieren voorradig zijn. Zo wordt optimaal gebruik gemaakt van beschikbare proefdieren en restmaterialen.**
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, geef ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **Varkens worden gedood volgens de richtlijn. Dit is noodzakelijk om de organen te isoleren en voorkomt dat de werking van stoffen in grotere aantallen levende dieren bestudeerd moet worden, wat het totale ongerief zou doen toenemen.**
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? **De DEC is van mening dat de NTS een goede weergave is van het project en dat deze begrijpelijk is geformuleerd.**

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.A*). **De centrale morele vraag is: mag je 120 varkens houden en doden, en een klein deel daarvan een injectie geven, om meer te weten over dysfunctie van darm, nier en lever, ten behoeve van de ontwikkeling van therapieën voor mens-patiënten?**
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*). **Het aantal patiënten met metabole complicaties blijft stijgen en zo ontstaat er een steeds grotere behoefte aan nieuwe medicatie voor deze patiënten. Deze patiënten kunnen ernstig lijden door het falen van organen. Lever, nier en/of darm kunnen aangedaan zijn. Het gaat dus om grote belangen van grote aantallen patiënten met mogelijk ernstige aandoeningen. Bij de dierproeven en bij de verzorging, behandeling en huisvesting van de dieren wordt adequaat invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven. Desondanks zullen er**

binnen dit project maximaal 120 varkens terminaal ongerief ondervinden, en sommige licht ongerief, door respectievelijk het overlijden en door injecties.

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 acht het ethisch toelaatbaar om 120 varkens te houden en te doden, en een klein deel daarvan een injectie te geven, om meer te weten te komen over dysfunctie van darm, nier en lever, ten behoeve van de ontwikkeling van therapieën voor de mens. Er is voldoende kennis en kunde aanwezig bij de instelling en in het netwerk daaromheen om dit onderzoek goed te doen. Alternatieven (voornamelijk het gebruik van slachtafval) zijn opgenomen in de strategie, 3V-methoden. Het ongerief is nooit meer dan licht. De DEC acht het haalbaar dat door het uitvoeren van deze studies informatie wordt gegenereerd in een preklinische setting, zodat in de nabije toekomst de onderzoeksmethodiek en de validatie-informatie bruikbaar is om toe te passen op humaan materiaal. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het gebruik van de dieren in dit project gerechtvaardigd is.**

E. Advies

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

De DEC was na lezing van de eerste versie van het projectvoorstel al positief over de strekking van het onderzoek en het gebruik van alternatieven en 3V-methoden. Echter, zij had een aantal vragen die het maken van een precieze afweging bemoeilijkten. Het ging hierbij vooral om hoe geborgd was dat alternatieven benut werden, om haalbaarheid, maar ook om de precieze vaststelling van het aantal benodigde dieren. De uitleg door de aanvrager is voldoende gebleken en heeft niet tot nieuwe discussie geleid. Ook maakte de letterlijke verwerking van de antwoorden in de projectaanvraag het wegen moeilijk. De DEC heeft gevraagd aan de onderzoeker om de aanvraag te herzien en de antwoorden niet integraal op te nemen in de aanvraag.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO

Postbus 96800

2509 JE DEN HAAG



**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
AVD501002017888

Datum 10 maart 2017

Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 28 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bestuderen van functie e farmacokinetiek in organen (darm/lever/nier) voor wetenschappelijk onderzoek" met aanvraagnummer AVD501002017888. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

In de NTS staat onder 3.1 beschreven: "Het aantal patiënten met overgewicht en de daarbij behorende gezondheidsproblemen neemt toe." Dit suggereert dat uw onderzoek enkel op mensen met overgewicht is gericht. Uit het Projectvoorstel blijkt echter dat uw onderzoek zich richt op patienten met metabole dysfunctie; waarvan overgewicht de oorzaak kan zijn. Hiermee geeft de NTS geen goed beeld van uw onderzoek. Wilt u de NTS aanpassen zodat het doel van uw project duidelijker is weergegeven?

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. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

Datum:

10 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD501002017888

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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO

Postbus 96800

2509 JE DEN HAAG



**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
AVD501002017888

Bijlagen

1

Datum 24 maart 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 28 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bestuderen van functie en farmacokinetiek in organen (darm/lever/nier) voor wetenschappelijk onderzoek" met aanvraagnummer AVD501002017888. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 14 maart 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een nieuwe NTS.

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 "Bestuderen van functie en farmacokinetiek in organen (darm/lever/nier) voor wetenschappelijk onderzoek" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een project voor maximaal 5 jaar vergund kan worden.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-TNO gevoegd. 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:
24 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD501002017888

Bezwaar

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

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

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

ir. G. de Peute
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: TNO
Adres: Postbus 96800
Postcode en plaats: 2509 JE DEN HAAG
Deelnemersnummer: 50100

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Bestuderen van functie en farmacokinetiek in organen (darm/lever/nier) voor wetenschappelijk onderzoek" met aanvraagnummer AVD501002017888, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-TNO. 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 28 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 28 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 14 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 28 februari 2017, ontvangen op 28 februari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 14 maart 2017

| Naam proef | Diersoort/ Stam | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|---------------|-------------------------------------|-------------|
| 3.4.4.1 Ex vivo bestuderen van functie en farmacokinetiek van stoffen in lever/nier/darm | | | | |
| | Varkens (<i>Sus scrofa domestica</i>) / | 120 | 98% Terminaal 2% 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.

Aanvraagnummer:
AVD501002017888

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:
AVD501002017888

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:
AVD501002017888

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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