

Inventaris Wob-verzoek W17-09									
nr.	document	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2017838								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud				x			x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud				x			x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
10	Reactie aanvulling aanvraag				x		x	x	
11	Bijlage beschrijving dierproeven 1 nieuw				x			x	
12	Bijlage beschrijving dierproeven 2 nieuw				x			x	
13	Bijlage beschrijving dierproeven 3 nieuw				x			x	
14	Advies CCD		x						x
15	Beschikking en vergunning				x		x	x	

22 FEB. 2017



Centrale Commissie Dierproeven

AVD401002017 838

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 40100 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																								
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Naam instelling of organisatie</td> <td colspan="2">Stichting Wageningen Research</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td colspan="2">[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td colspan="2">908104</td> </tr> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Akkermaalsbos</td> <td style="text-align: right;">12</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td colspan="2">59</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6700AB</td> <td>Wageningen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td colspan="2">NL10RABO0397066465</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td colspan="2">Wageningen UR</td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Wageningen Research		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]		KvK-nummer	908104		Straat en huisnummer	Akkermaalsbos	12	Postbus	59		Postcode en plaats	6700AB	Wageningen	IBAN	NL10RABO0397066465		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR	
Naam instelling of organisatie	Stichting Wageningen Research																									
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																									
KvK-nummer	908104																									
Straat en huisnummer	Akkermaalsbos	12																								
Postbus	59																									
Postcode en plaats	6700AB	Wageningen																								
IBAN	NL10RABO0397066465																									
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR																									
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 border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td style="text-align: right;"><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" 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 type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]										
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.																								
Functie	[REDACTED]																									
Afdeling	[REDACTED]																									
Telefoonnummer	[REDACTED]																									
E-mailadres	[REDACTED]																									
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td style="text-align: right;"><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" 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 type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]										
(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.	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td style="text-align: right;"><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" 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 type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]										
(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 | | <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 | 29 - 4 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- In ovo vaccinatie Infectieuze bronchitis virus in kippen
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- In ovo vaccinatie Infectieuze bronchitis virus in kippen
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|--|
| Naam DEC | DEC-WUR |
| Postadres | Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen |
| E-mailadres | DEC@wur.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1541 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur

5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht**
- Projectvoorstel + 3 bijlagen
 Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing**
- Melding Machtiging
 bestelorder WUR1037550

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam	[Redacted]
Functie	[Redacted]
Plaats	Wageningen
Datum	20 - 2 - 2017
Handtekening	[Redacted]

2.

**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'.
- 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 of routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
- 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.

Infectieuze bronchitis virus (IBV) is zeer besmettelijk en veroorzaakt o.a. luchtweg problemen en nier/oviduct beschadigingen in kippen, tevens vermindert het de eiproductie in legkippen. De enige manier om deze ziekte in pluimvee te voorkomen is door vaccinatie. Verschillende vaccins tegen een brede variatie van serotypen van IB zijn commercieel verkrijgbaar en worden over het algemeen via een spray toegediend bij kuikens met een leeftijd van 1 dag oud. Het is belangrijk dat kippen op een jonge leeftijd beschermd worden omdat deze het meest vatbaar zijn voor de ziekte en bovendien bevinden de oviducts en nieren zich nog in de ontwikkelingsfase. Tegenwoordig zijn er vaccins verkrijgbaar die worden toegediend aan 19-daagse bebroede eieren. Deze vaccinatie methode (*in ovo* vaccinatie) wordt voornamelijk gebruikt voor de ziekte van Marek, maar is ook erg aantrekkelijk voor andere pluimvee ziekten vooral omdat het resulteert in een erg vroege bescherming. Een ander voordeel is dat met behulp van gespecialiseerde apparatuur vele duizenden eieren tegelijkertijd gevaccineerd kunnen worden met dezelfde dosis vaccin. Daarom is er een uitgebreid onderzoeksplan opgezet om *in-ovo* IBV vaccins te testen op werkzaamheid en deze studies worden uitgevoerd volgens de Europese farmacopee monograaf. Een farmacopee is een officieel, van staatswege uitgegeven handboek met voorschriften voor de bereiding van geneesmiddelen voor menselijk en dierlijk gebruik, en de vereisten waaraan zij moeten voldoen.

In een eerdere aanvraag [redacted] zijn verschillende vaccins [redacted] getest, waarvan [redacted] kandidaten succesvol met beschermingspercentages tegen infectie met IBV van [redacted] deze resultaten zijn verkregen met de ciliostasis test zoals beschreven in de Europese farmacopee (EP). De richtlijn van de EP stelt dat vaccins voldoen als een beschermingspercentage hoger dan 80% wordt behaald. De huidige aanvraag betreft een vervolg in het testen van vaccin kandidaten die sterk lijken op de eerder geteste succesvolle kandidaten en welke slechts verschillen door de [redacted] in het [redacted] gen. Het doel van de huidige aanvraag is het uitgebreid testen van deze gerepareerde vaccin kandidaten. De proeven zijn verplicht voor productregistratie en gebaseerd op de Europese farmacopee. De Europese Farmacopee (Ph. Eur.) heeft op het Nederlandse grondgebied rechtskracht, zowel voor humane als veterinaire geneesmiddelen.

In dit project worden de minimale dosering, de werkzaamheid in dieren met maternale immuniteit en de duur van immuniteit van de vaccin-kandidaten getest.

In het eerste experiment wordt de dosering van de vaccin kandidaten getest om een beeld te krijgen van de minimale dosis nodig voor bescherming, dit wordt gedaan in SPF eieren. Aan de hand van deze resultaten worden vaccin kandidaten geselecteerd om te testen in eieren afkomstig van dieren met antistoffen tegen IBV, in deze te vaccineren embryo's zijn maternale antistoffen aanwezig. Omdat de uiteindelijke *in-ovo* vaccinatie zal plaatsvinden in conventionele bebroede eieren, zijn de resultaten van deze proef zeer relevant. Er zal worden gevaccineerd met een dosis vaccin die gerelateerd is aan het eerste experiment.

In het derde experiment wordt de duur van de immuniteit getest op beste vaccin-kandidaat/kandidaten uit de tweede proef. In de eerste proef zijn de dieren op een leeftijd van 21 dagen gechallengeerd en in deze derde proef zal de tijd tussen vaccinatie en challenge verlengd worden naar 42 en 56 dagen leeftijd. Om deze resultaten goed te kunnen vergelijken met experiment 1 worden er wederom SPF eieren gevaccineerd.

Er zal worden getest op de volgende parameters; uitkomst percentage, gezondheid van de kulkens, serologie en bescherming na een IBV infectie. De uitleesparameter van de bescherming is de ciliostasis test, deze staat beschreven in de Europese farmacopee. Kort samengevat; de beweging van de cilia (trilharen) in de trachea wordt microscopisch bekeken en gescoord. Er worden per trachea 10 ringen beoordeeld (3 onder, 4 midden en 3 boven). De score per ring is 0 indien 50% of meer van de cilia in de ring bewegen en 1 indien minder dan 50% van de cilia bewegen. Een dier wordt beschouwd als beschermd als in 9 van de 10 ringen de cilia beweging 50% of meer is.

3.2 Purpose

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

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

Het doel van het project is om de werkzaamheid van [REDACTED] vaccin kandidaten te testen als een *in-ovo* vaccin. De bescherming van deze vaccins worden getest in een challenge model. De haalbaarheid van dit project wordt als goed ingeschat, mede door ervaring vanuit de eerdere aanvraag. Er is expertise opgebouwd van zowel het challenge model als van de ciliostasis test.

3.3 Relevance

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

Vaccin toediening via de *in-ovo* route is veiliger en niet belastend voor het doeldier. De vaccinatie is effectiever omdat elk dier de juiste dosis ontvangt, in tegenstelling tot spray vaccinatie waar meer variatie in het ontvangen van het vaccin mogelijk is. Tevens levert de *in-ovo* vaccinatie geen extra stress op voor het dier na de uitkomst uit het ei in tegenstelling tot andere vaccinatie-methoden.

3.4 Research Strategy

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

De strategie is om werkzaamheid van diverse *in-ovo* vaccin-kandidaten te testen volgens de richtlijnen aangegeven in de Europese farmacopee. Deze testen zijn noodzakelijk voor productregistratie.

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

In dit project worden de minimale dosering (experiment 1), de werkzaamheid in dieren met maternale immuniteit (experiment 2) en de duur van immuniteit (experiment 3) van de vaccin-kandidaten getest.

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 dit project worden de minimale dosering, de werkzaamheid in dieren met maternale immuniteit en de duur van immuniteit van de vaccin-kandidaten getest.

In het eerste experiment wordt de dosering van de vaccin kandidaten getest om een beeld te krijgen van de minimale dosis nodig voor bescherming, dit wordt gedaan in SPF eieren.

Tweede experiment: Aan de hand van deze resultaten worden vaccin kandidaten geselecteerd [REDACTED] om te testen in eieren afkomstig van dieren met antistoffen tegen IBV, in deze te vaccineren embryo's zijn maternale antistoffen aanwezig. Omdat de uiteindelijke *in-ovo* vaccinatie zal plaatsvinden in conventionele bebroede eieren, zijn de resultaten van deze proef zeer relevant. Er zal worden gevaccineerd met een dosis vaccin die gerelateerd is aan het eerste experiment.

In het derde experiment wordt de duur van de immuniteit getest op beste vaccin-kandidaat/kandidaten [REDACTED] uit de tweede proef. In de eerste proef zijn de dieren op een leeftijd van 21 dagen gechallengeerd en in deze derde proef zal de tijd tussen vaccinatie en challenge verlengd worden naar 42 en 56 dagen leeftijd. Om deze resultaten goed te kunnen vergelijken met experiment 1 worden er wederom SPF eieren gevaccineerd.

Er zal worden getest op de volgende parameters; uitkomst percentage, gezondheid van de kuikens, serologie en bescherming na een IBV infectie. De uitleesparameter van de bescherming is de ciliostasis test, deze staat beschreven in de Europese farmacopee. Kort samengevat; de beweging van de cilia (trilharen) in de trachea wordt microscopisch bekeken en gescoord. Er worden per trachea 10 ringen beoordeeld (3 onder, 4 midden en 3 boven). De score per ring is 0 indien 50% of meer van de cilia in de ring bewegen en 1 indien minder dan 50% van de cilia bewegen. Een dier wordt beschouwd als beschermd als in 9 van de 10 ringen de cilia beweging 50% of meer is.

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	testen van de minimale dosering vaccin kandidaat voor bescherming in SPF kippen.

Serial number	Type of animal procedure
2	testen van de werkzaamheid in dieren met maternale immuniteit ook volgens de EP monograaf.
3	testen van de duur van de bescherming, met een challenge op 6 weken na vaccinatie en een challenge 8 weken na vaccinatie.

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100					
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research					
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="451 1173 587 1191">Serial number</th> <th data-bbox="951 1173 1417 1238">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="451 1193 587 1299">1</td> <td data-bbox="951 1193 1417 1299">testen van de minimale dosering vaccin kandidaat voor bescherming in SPF kippen.</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	1	testen van de minimale dosering vaccin kandidaat voor bescherming in SPF kippen.	
Serial number	Type of animal procedure						
1	testen van de minimale dosering vaccin kandidaat voor bescherming in SPF kippen.						

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.

De 19-daagse bebroede eieren worden *in-ovo* gevaccineerd met 2 verschillende doseringen van [redacted] IBV vaccin- [redacted] tezamen met een placebo vaccinatie (1 controlegroep).

In totaal worden er op deze manier [redacted].

De *in-ovo* vaccinatie wordt uitgevoerd in een [redacted] dierruimte per groep en in dezelfde ruimte worden de eieren uitgebroed. Zodra de eieren uitkomen wordt het uitkomst percentage bepaald en de gezondheid van de kuikens wordt geïnspecteerd en worden ze in beide vleugels gemerkt met een uniek nummer per dier. De kuikens worden vervolgens gedurende 21 dagen dagelijks verzorgd en geobserveerd. Op de leeftijd van 21 dagen wordt een serum-bloedmonster afgenomen om de immunstatus van het dier te bepalen. Tevens worden de dieren geïnfecteerd (challenge) met IBV virus via oogdruppeling. Na de challenge worden de dieren gedurende 5 dagen 2x per dag klinisch geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de kippen geëuthanaseerd en worden tijdens de sectie de trachea's (luchtpijp) microscopisch onderzocht (ciliostase test) zoals voorgeschreven in de Europese farmacopee (pg. 721). De aan- of afwezigheid van bewegende cilia (trilharen) in de trachea geven de mate van bescherming aan. Zijn de cilia intact dan is een gevaccineerd dier beschermd tegen het challenge virus. Bij de controle dieren die niet gevaccineerd zijn cilia niet meer intact. Via een score-systeem wordt de mate van bescherming vastgesteld.

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

De *in-ovo* vaccinatie wordt 1 maal toegepast, het vaccin wordt in het 19-daags bebroede ei gespoten bij voorkeur in het embryo (in minstens 50% van de eieren per groep). Indien de injectienaald het embryo niet kan bereiken (dat is te voelen) heeft dit tot gevolg dat het vaccin in de amnion holte zal terechtkomen. In voorgaande proeven leek er [redacted] waarin er [redacted] voorkwam bij de [redacted] eieren.

Na de uitkomst worden de dieren dagelijks verzorgd en geobserveerd. Als de kuikens 21 dagen oud zijn wordt er een bloedmonster genomen om de antilichaamsrespons gericht tegen het vaccin-virus vast te stellen. Door randomisatie worden 20 dieren per groep geselecteerd voor de challenge met IBV virus, deze challenge wordt gedaan via oogdruppeling. De dieren worden vervolgens gedurende vijf dagen 2x daags verzorgd en klinische geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de dieren geëuthanaseerd.

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

In de Europese farmacopee Avian infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2) staat beschreven dat per vaccingroep niet minder dan 20 dieren moeten worden gebruikt voor het vaccinatie/challenge experiment.

Echter omdat hier begonnen wordt met bebroede eieren, is ervoor gekozen om met 30 eieren per groep te starten. Hiermee wordt ondervangen dat voor de uiteindelijke effectiviteitsstudie (challenge) te weinig kuikens beschikbaar zijn, waardoor het experiment ongeldig zou zijn. In ovo vaccinatie wordt veelvuldig toegepast en geeft weinig embryo verliezen. In een kleinschalig experiment moet er echter altijd rekening mee gehouden worden dat door toeval in een groep meer embryonale sterfte optreedt dan gemiddeld. Embryonale sterfte kan optreden als gevolg van toeval (niet gerelateerd aan de in ovo vaccinatie), maar ook door de in ovo vaccinatie (door het mechanische proces of als gevolg van het IBV vaccin). De bebroede eieren worden dagelijks geschouwd, dit betekent dat mbv een lamp wordt gekeken of het embryo nog leeft.

Ervaring uit eerdere proeven:

■ vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van ■ tot slechts ■

■ vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van ■

■ keer controle groep(■): uitkomstpercentages ■

Uitval tijdens opgroei-periode tot leeftijd 21 dagen varieerde van ■ dieren per groep.

Euthanasie door randomisatie op dag van challenge:

Totaal zijn er in de geteste ■ groepen, ■ dieren geëuthanaseerd op 21 dagen leeftijd.

In geval van de groep met uitkomst van ■ en uitval van ■ dieren betekende het dat slechts ■ dier voor de challenge geëuthanaseerd moest worden.

Bovenstaande geeft aan dat een start met 30 eieren een realistische inschatting geeft om het beoogde aantal van 20 dieren voor challenge te behalen.

B. The animals

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

Er worden kuikens (leghennen of broilers) gebruikt die uit SPF eieren zijn uitgebroed.

Er worden maximaal 90 stuks bebroede eieren per experiment gebruikt. Het experiment bestaat uit ■ groepen eieren (■) in twee groepen wordt het vaccin toegediend in twee verschillende doseringen en de derde groep betreft de ongevaccineerde ■ controle groep. In totaal zullen er op deze manier ■ vaccinkandidaten getest worden en dat betekent dus dat er in totaal ■ bebroede eieren gebruikt zullen worden. Indien alle eieren per experiment (=1 vaccin kandidaat) uitkomen is er sprake van 90 kippen (totaal van ■). De challenge met het IBV virus op de leeftijd van 21 dagen wordt uitgevoerd op 20 dieren per groep. De overige dieren (surplus) worden door randomisatie uit de proef gehaald en geëuthanaseerd. De dieren die gechallengeed zijn zullen op een leeftijd van 26 dagen of eerder (Indien ernstige kliniek) worden geëuthanaseerd.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Vervanging: kip is het doeldier, vervanging is niet mogelijk omdat er geen in-vitro systeem bestaat om bescherming aan te tonen. Vermindering: Er wordt uitgegaan van de Europese farmacopee infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2), waarin staat aangegeven dat er minimaal 20 dieren voor een vaccinatie/challenge experiment gebruikt moeten worden. Om te voorkomen dat het experiment ongeldig wordt door een te hoge embryonale sterfte en uitval na uitkomst wordt begonnen met 30 eieren. Bij uitval van 30% eieren/kuikens (ook een maat voor veiligheid van het vaccin) kan dan nog steeds de effectiviteit op een valide manier worden bepaald. Verfijning: De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

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

De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

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.

Er is geen sprake van herhaling van het testen van eenzelfde vaccin kandidaat. De uitvoering van de proef is als vermeldt in [REDACTED] echter nu wordt [REDACTED] vaccin kandidaat getest per experiment met twee verschillende doseringen. Er worden maximaal [REDACTED] vaccinkandidaten getest.

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?

Embryonale sterfte, dit betekent het niet uitkomen van de eieren. IBV kliniek; Lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en benauwdheid

Explain why these effects may emerge.

Embryonale sterfte: mogelijk door in-ovo vaccinatie (door vaccin-virus of schade door injectienaald) of aspecifieke sterfte (geen duidelijke oorzaak)
IBV kliniek: Challenge met IBV virus

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

Door het toepassen van de humane eindpunten

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

In-ovo vaccinatie is niet pijnlijk, de gezondheid van de kuikens wordt dagelijks en vanaf challenge tot aan het einde van de proef 2x daags geobserveerd mbv een score lijst waarin in IBV ziekteverschijnselen (lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en ademhaling) staan vermeldt. Elk verschijnsel wordt beoordeeld met een geen (0), milde (1) of ernstige score (2). Het humane eindpunt wordt bereikt bij ernstige benauwdheid (score 2 ademhaling) OF bij een totale score van ≥ 7 bij een tijdsduur van meer dan 2 opeenvolgende dagen. Ervaring vorige dierproeven: [redacted] kliniek in de controle groep, [redacted] gescoord voor maximaal [redacted] dag in [redacted] dieren, in de overige [redacted] dieren geen kliniek gezien. In [redacted] vaccingroep [redacted] in de [redacted] dood [redacted] en [redacted] dier [redacted] dag [redacted]. Dus bovenstaande criteria zijn opgesteld voor een zeer hevige challenge, dit is niet onze ervaring in voorgaande proeven. De ciliostasis test resulteerde in [redacted] in de controle groep, in tegenstelling tot de cilia van de gevaccineerde dieren [redacted]. Dus ondanks de [redacted] is er door deze test [redacted] tussen de beschermde en onbeschermde dieren.

Indicate the likely incidence.

Met inzicht uit vorige proeven: In de vaccin-groepen is de kans 0-20% en in de controle groep 0-50%

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).

De in-ovo vaccinatie: geen ongerief Bloedafname: licht ongerief Challenge: matig ongerief (bij toepassen humane eindpunten) Resultierend in een overall ongerief van matig

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

L. Method of killing

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

Ciliostase test is een essentieel onderdeel van de proef

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

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

Yes

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure testen van de werkzaamheid in dieren met maternale immuniteit ook volgens de EP monograaf.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In deze studie wordt de werkzaamheid getest in dieren met maternale immuniteit. Hiertoe worden 19-daagse bebroede eieren in-ovo gevaccineerd met meest geschikte vaccin-kandidaten uit studie 1 [REDACTED] tezamen met een placebo vaccinatie (1 controlegroep).

De experimentele opzet is hetzelfde als studie 1. De *in-ovo* vaccinatie wordt uitgevoerd in een [REDACTED] dierruimte per groep en in dezelfde ruimte worden de eieren uitgebroed. Zodra de eieren uitkomen wordt het uitkomst percentage bepaald en de gezondheid van de kuikens wordt geïnspecteerd en worden ze in beide vleugels gemerkt met een uniek nummer per dier. De kuikens worden vervolgens gedurende 21 dagen dagelijks verzorgd en geobserveerd. Op de leeftijd van 21 dagen wordt een serum-bloedmonster afgenomen om de immunestatus van het dier te bepalen. Tevens worden de dieren geïnfecteerd (challenge) met IBV virus via oogdruppeling. Na de challenge worden de dieren gedurende 5 dagen 2x per dag klinisch geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de kippen geëuthanaseerd en worden tijdens de sectie de trachea's (luchtpijp) microscopisch onderzocht (ciliostase test) zoals voorgeschreven in de Europese farmacopee (pg. 721). De aan- of afwezigheid van bewegende cilia (trilharen) in de trachea geven de mate van bescherming aan. Zijn de cilia intact dan is een gevaccineerd dier beschermd tegen het challenge virus. Bij de controle dieren die niet gevaccineerd zijn cilia niet meer intact. Via een score-systeem wordt de mate van bescherming vastgesteld.

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

De in-ovo vaccinatie wordt 1 maal toegepast, het vaccin wordt in het 19-daags bebroede ei gespoten bij voorkeur in het embryo (in minstens 50%). Indien de injectienaald het embryo niet kan bereiken (dat is te voelen) is de consequentie dat het vaccin in de amnion holte zal worden gespoten. In voorgaande proeven leek er een [REDACTED] waarin er [REDACTED] voorkwam bij de [REDACTED] eieren. [REDACTED]

[REDACTED] van de eieren als [REDACTED]. Na de uitkomst worden de dieren dagelijks verzorgd en geobserveerd. Als de kuikens 21 dagen oud zijn wordt er een bloedmonster genomen om de antilichaamsrespons gericht tegen het vaccin-virus vast te stellen. Door randomisatie worden 20 dieren per groep geselecteerd voor de challenge met IBV virus, deze challenge wordt gedaan via oogdruppeling. De dieren worden vervolgens gedurende vijf dagen 2x daags verzorgd en klinische geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de dieren geëuthanaseerd.

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

In de Europese farmacopee Avian infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2) staat beschreven dat per vaccingroep niet minder dan 20 dieren moeten worden gebruikt voor het vaccinatie/challenge experiment. Echter omdat hier begonnen wordt met bebroede eieren, is ervoor gekozen om met 30 eieren per groep te starten. Hiermee wordt ondervangen dat voor de uiteindelijke effectiviteitsstudie (challenge) te weinig kuikens beschikbaar zijn, waardoor het experiment ongeldig zou zijn. In ovo vaccinatie wordt veelvuldig toegepast en geeft weinig embryo verliezen. In een kleinschalig experiment moet er echter altijd rekening mee gehouden worden dat door toeval in een groep meer embryonale sterfte optreedt dan gemiddeld. Embryonale sterfte kan optreden als gevolg van toeval (niet gerelateerd aan de in ovo vaccinatie), maar ook door de in ovo vaccinatie (door het mechanische proces of als gevolg van het IBV vaccin). De bebroede eieren worden dagelijks geschouwd, dit betekent dat mbv een lamp wordt gekeken of het embryo nog leeft.

Ervaring uit eerdere proeven:

■ vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van ■ tot slechts ■

■ twee vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van ■

keer controle groep(■): uitkomstpercentages ■

Uitval tijdens opgroei-periode tot leeftijd 21 dagen varieerde van minimaal ■ tot maximaal ■ dieren per groep.

Euthanasie door randomisatie op dag van challenge:

Totaal zijn er in de geteste ■ groepen, ■ dieren geëuthanaseerd op 21 dagen leeftijd.

In geval van de groep met uitkomst van ■ en uitval van ■ dieren betekende het dat slechts ■ dier voor de challenge geëuthanaseerd moest worden.

Bovenstaande geeft aan dat een start met 30 eieren een realistische inschatting geeft om het beoogde aantal van 20 dieren voor challenge te behalen.

B. The animals

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

Er worden kuikens (leghennen of broilers) gebruikt die uit commerciële eieren zijn uitgebroed. De moeder-flock wordt getest op aanwezigheid van antilichamen tegen infectieuze bronchitis (dit is een selectie criterium voor het gebruik van de eieren voor de proef). Er worden maximaal ■ stuks bebroede eieren gebruikt, dit betekent in totaal ■ vaccinkandidaten ■ en ■ controle groep ■. De controle groep bestaat uit ■ eieren omdat er ■ eieren gereserveerd worden voor het bepalen van de immunusstatus van deze dieren (maternale antilichamen tegen IBV). Na uitkomst zullen er ■ kuikens na het nemen van de bloedmonsters niet deelnemen aan de proef en worden geëuthanaseerd. Er worden dus ■ eieren uitgebroed alleen voor bloedafname. De dierproef gaat verder met ■ eieren/kuikens per groep.

De challenge met het IBV virus op de leeftijd van 21 dagen wordt uitgevoerd op 20 dieren per groep. De overige dieren (surplus*) worden gerandomiseerd uit de proef gehaald en geëuthanaseerd.

De dieren die gechallengeed zijn zullen op een leeftijd van 26 dagen of eerder (indien ernstige kliniek) worden geëuthanaseerd. Tijdens sectie wordt de bescherming tegen de challenge getest op trachea's adhv de cilliositas test.

* Surplus dieren: Er zal een evaluatie plaatsvinden na het eerste experiment (bijlage 1) om te bepalen of het aantal surplus dieren (max ■ per groep) naar beneden bijgesteld kan worden. Dit zal gebeuren in overleg met de IVD.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Vervanging: kip is het doeldier, vervanging is niet mogelijk omdat er geen in-vitro systeem bestaat om bescherming aan te tonen. Vermindering: Er wordt uitgegaan van de Europese farmacopee infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2), waarin staat aangegeven dat er minimaal 20 dieren voor een vaccinatie/challenge experiment gebruikt moeten worden. Om te voorkomen dat het experiment ongeldig wordt door een te hoge embryonale sterfte en uitval na uitkomst wordt begonnen met 30 eieren. Bij uitval van 30% eieren/kulkens (ook een maat voor veiligheid van het vaccin) kan dan nog steeds de effectiviteit op een valide manier worden bepaald. Verfijning: De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

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

De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te

pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringsysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

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.

Er is geen sprake van herhaling van het testen van eenzelfde vaccin kandidaat. De uitvoering van de proef is als vermeldt in [REDACTED] echter nu worden er maximaal [REDACTED] kandidaten getest en zijn de kuikens afkomstig uit conventionele bebroede eieren.

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?

Embryonale sterfte, dit betekent het niet uitkomen van de eieren. IBV kliniek; Lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeijing, waterige ogen en benauwdheid

Explain why these effects may emerge.

Embryonale sterfte: mogelijk door in-ovo vaccinatie (door vaccin-virus of schade door injectienaald) of aspecifieke sterfte (geen duidelijke oorzaak)
IBV kliniek: Challenge met IBV virus

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

Door het toepassen van de humane eindpunten

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

In-ovo vaccinatie is niet pijnlijk, de gezondheid van de kuikens wordt dagelijks en vanaf challenge tot aan het einde van de proef 2x daags geobserveerd mbv een score lijst waarin in IBV ziekteverschijnselen (lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvoeiing, waterige ogen en benauwdheid) staan vermeldt. Elk verschijnsel wordt beoordeeld met een geen (0), milde (1) of ernstige score (2). Het humane eindpunt wordt bereikt bij ernstige benauwdheid (score 2 ademhaling) OF bij een totale score van ≥ 7 bij een tijdsduur van meer dan 2 opeenvolgende dagen.

Ervaring vorige dierproeven: [redacted] kliniek in de controle groep, [redacted] gescoord voor maximaal [redacted] dag in [redacted] dieren, in de overige [redacted] dieren geen kliniek gezien. In [redacted] vaccingroep [redacted], in de [redacted] dood [redacted] en [redacted] dier [redacted] dag [redacted]. Dus bovenstaande criteria zijn opgesteld voor een zeer hevige challenge, dit is niet onze ervaring in voorgaande proeven. De ciliostasis test resulteerde in [redacted] in de controle groep, in tegenstelling tot de cilia van de gevaccineerde dieren [redacted]. Dus ondanks de [redacted] is er door deze test [redacted] tussen de beschermde en onbeschermde dieren.

Indicate the likely incidence.

Met inzicht uit vorige proeven: In de vaccin-groepen is de kans 0-20% en in de controle groep 0-50%

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).

De in-ovo vaccinatie: geen ongerief Bloedafname: licht ongerief Challenge: matig ongerief (bij toepassen humane eindpunten) Resultierend in een overall ongerief van matig

End of experiment

L. Method of killing

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.

Ciliostase test is een essentieel onderdeel van de proef

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

6.

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100		
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research		
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><tr><td>Serial number 3</td><td>Type of animal procedure testen van de duur van de bescherming, met een challenge op 6 weken na vaccinatie en een challenge 8 weken na vaccinatie.</td></tr></table>	Serial number 3	Type of animal procedure testen van de duur van de bescherming, met een challenge op 6 weken na vaccinatie en een challenge 8 weken na vaccinatie.
Serial number 3	Type of animal procedure testen van de duur van de bescherming, met een challenge op 6 weken na vaccinatie en een challenge 8 weken na vaccinatie.			

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In dit experiment wordt de duur van bescherming/immunitet onderzocht aan de hand van een challenge op 6 weken leeftijd en op 8 weken leeftijd, dit in tegenstelling tot de eerdere experimenten waarbij de challenge op een leeftijd van 3 weken uitgevoerd werd.

De verdere proefopzet is verder gelijk aan studie 1.

Er worden 19-daagse bebroede eieren in-ovo gevaccineerd met de meest geschikte vaccin-kandidaten uit studie 1 en 2 tezamen met een placebo vaccinatie (1 controlegroep).

De *in-ovo* vaccinatie wordt uitgevoerd in een dierruimte per groep en in dezelfde ruimte worden de eieren uitgebroed. Zodra de eieren uitkomen wordt het uitkomst percentage bepaald en de gezondheid van de kuikens wordt geïnspecteerd en worden ze in beide vleugels gemerkt met een uniek nummer per dier. De kuikens worden vervolgens gedurende 21 dagen dagelijks verzorgd en geobserveerd. Op de leeftijd van 21 dagen wordt een serum-bloedmonster afgenomen om de immunestatus van het dier te bepalen. Tevens worden de dieren geïnfecteerd (challenge) met IBV virus via oogdruppeling. Na de challenge worden de dieren gedurende 5 dagen 2x per dag klinisch geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de kippen geëuthanaseerd en worden tijdens de sectie de trachea's (luchtpijp) microscopisch onderzocht (ciliostase test) zoals voorgeschreven in de Europese farmacopee (pg. 721). De aan- of afwezigheid van bewegende cilia (trilharen) in de trachea geven de mate van bescherming aan. Zijn de cilia intact dan is een gevaccineerd dier beschermd tegen het challenge virus. Bij de controle dieren die niet gevaccineerd zijn cilia niet meer intact. Via een score-systeem wordt de mate van bescherming vastgesteld.

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

De in-ovo vaccinatie wordt 1 maal toegepast, het vaccin wordt in het 19-daags bebroede ei gespoten bij voorkeur in het embryo (in minstens). Indien de injectienaald het embryo niet kan bereiken (dat is te voelen) is de consequentie dat het vaccin in de amnion holte zal worden gespoten. In voorgaande proeven leek er waarin er voorkwam bij de eieren.

Na de uitkomst worden de dieren dagelijks verzorgd en geobserveerd. Als de kuikens 21 dagen oud zijn wordt er een bloedmonster genomen om de antilichaamsrespons gericht tegen het vaccin-virus vast te stellen. Door randomisatie worden 20 dieren per groep geselecteerd voor de challenge met IBV virus, deze challenge wordt gedaan via oogdruppeling. De dieren worden vervolgens gedurende vijf dagen 2x daags verzorgd en klinische geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de dieren geëuthanaseerd.

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

In de Europese farmacopee Avian infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2) staat beschreven dat per vaccingroep niet minder dan 20 dieren moeten worden gebruikt voor het vaccinatie/challenge experiment. Echter omdat hier begonnen wordt met bebroede eieren, is ervoor gekozen om met 30 eieren per groep te starten. Hiermee wordt ondervangen dat voor de uiteindelijke effectiviteitsstudie (challenge) te weinig kuikens beschikbaar zijn, waardoor het experiment ongeldig zou zijn. In ovo vaccinatie wordt veelvuldig toegepast en geeft weinig embryo verliezen. In een kleinschalig experiment moet er echter altijd rekening mee gehouden worden dat door toeval in een groep meer embryonale sterfte optreedt dan gemiddeld. Embryonale sterfte kan optreden als gevolg van toeval (niet gerelateerd aan de in ovo vaccinatie), maar ook door de in ovo vaccinatie (door het mechanische proces of als gevolg van het IBV vaccin). De bebroede eieren worden dagelijks geschouwd, dit betekent dat mbv een lamp wordt gekeken of het embryo nog leeft.

Ervaring uit eerdere proeven:

■ vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van ■
■ vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van ■
■ keer controle groep ■ uitkomstpercentages ■

Uitval tijdens opgroei-periode tot leeftijd 21 dagen varieerde van minimaal 2 tot maximaal 5 dieren per groep.

Euthanasie door randomisatie op dag van challenge:

Totaal zijn er in de geteste ■ groepen, ■ dieren geëuthanaseerd op 21 dagen leeftijd.

In geval van de groep met uitkomst van ■ en uitval van ■ dieren betekende het dat slechts ■ voor de challenge geëuthanaseerd moest worden.

Bovenstaande geeft aan dat een start met 30 eieren een realistische inschatting geeft om het beoogde aantal van 20 dieren voor challenge te behalen.

B. The animals

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

Er worden kuikens (leghennen of broilers) gebruikt die uit SPF eieren zijn uitgebreed.

Er worden maximaal 90 stuks bebroede eieren per experiment gebruikt. Het experiment bestaat uit ■ in twee groepen wordt het vaccin toegediend en de derde groep betreft de ongevaccineerde ■ controle groep, de challenge vindt plaats op twee verschillende tijdstippen. In totaal zullen er op deze manier ■ kandidaten getest worden en dat betekent dus dat er in totaal ■ bebroede eieren gebruikt zullen worden.

Indien alle eieren per experiment ■ uitkomen is er sprake van 90 kippen (totaal van 3x30 eieren per groep). De challenge met het IBV virus op de leeftijd van 21 dagen wordt uitgevoerd op 20 dieren per groep. De overige dieren (surplus*) worden door randomisatie uit de proef gehaald en geëuthanaseerd. De dieren die gechallengeed zijn zullen op een leeftijd van 26 dagen of eerder (indien ernstige kliniek) worden geëuthanaseerd.

* Surplus dieren: Er zal een evaluatie plaatsvinden na het eerste experiment (bijlage 1) om te bepalen of het aantal surplus dieren (max 10 per groep) naar beneden bijgesteld kan worden. Dit zal gebeuren in overleg met de IVD.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Vervanging: kip is het doeldier, vervanging is niet mogelijk omdat er geen in-vitro systeem bestaat om bescherming aan te tonen. Vermindering: Er wordt uitgegaan van de Europese farmacopee infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2), waarin staat aangegeven dat er minimaal 20 dieren voor een vaccinatie/challenge experiment gebruikt moeten worden. Om te voorkomen dat het experiment ongeldig wordt door een te hoge embryonale sterfte en uitval na uitkomst wordt begonnen met 30 eieren. Bij uitval van 30% eieren/kuikens (ook een maat voor veiligheid van het vaccin) kan dan nog steeds de effectiviteit op een valide manier worden bepaald. Verfijning: De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

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

De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

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.

Er is geen sprake van herhaling van het testen van eenzelfde vaccin kandidaat. De uitvoering van de proef is als vermeldt in echter nu wordt kandidaat getest per experiment met verschillende challenge tijdstippen. Er worden maximaal getest.

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?

Embryonale sterfte, dit betekent het niet uitkomen van de eieren. IBV kliniek; Lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeijing, waterige ogen en benauwdheid

Explain why these effects may emerge.

Embryonale sterfte: mogelijk door in-ovo vaccinatie (door vaccin-virus of schade door injectienaald) of specifieke sterfte (geen duidelijke oorzaak)
IBV kliniek: Challenge met IBV virus

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

Door het toepassen van de humane eindpunten

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

In-ovo vaccinatie is niet pijnlijk, de gezondheid van de kuikens wordt dagelijks en vanaf challenge tot aan het einde van de proef 2x daags geobserveerd mbv een score lijst waarin in IBV ziekteverschijnselen (lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en benauwdheid) staan vermeldt. Elk verschijnsel wordt beoordeeld met een geen (0), milde (1) of ernstige score (2). Het humane eindpunt wordt bereikt bij ernstige benauwdheid (score 2 ademhaling) OF bij een totale score van ≥ 7 bij een tijdsduur van meer dan 2 opeenvolgende dagen. Ervaring vorige dierproeven: [redacted] kliniek in de controle groep, [redacted] gescoord voor maximaal [redacted] dag in [redacted] dieren, in de overige [redacted] dieren geen kliniek gezien. In [redacted] vaccingroep [redacted], in de [redacted] dood [redacted] er [redacted] dag [redacted]. Dus bovenstaande criteria zijn opgesteld voor een zeer hevige challenge, dit is niet onze ervaring in voorgaande proeven. De ciliostasis test resulteerde in [redacted] in de controle groep, in tegenstelling tot de cilia van de gevaccineerde dieren [redacted]. Dus ondanks de [redacted] is er door deze test [redacted] tussen de beschermde en onbeschermde dieren.

Indicate the likely incidence.

Met inzicht uit vorige proeven: In de vaccin-groepen is de kans 0-20% en in de controle groep 0-50%

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).

De in-ovo vaccinatie: geen ongerief Bloedafname: licht ongerief Challenge: matig ongerief (bij toepassen humane eindpunten) Resultierend in een overall ongerief van matig

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.

Ciliostase test is een essentieel onderdeel van de proef

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



Postbus 65 | 8200 AB Lelystad

Centrale Commissie Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Wageningen
University & Research

DATUM
13 maart 2017

ONDERWERP
aanvraag projectvergunning
AVD401002017838

ONS KENMERK
AVD401002017838

POSTADRES

[REDACTED]

BEZOEKADRES

[REDACTED]

INTERNET
www.wur.nl

KVK NUMMER
09098104

CONTACTPERSOON

[REDACTED]

TELEFOON

[REDACTED]

E-MAIL
DEC@wur.nl

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR heeft gegeven aangaande het project "In ovo vaccinatie Infectieuze bronchitis virus in kippen"

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD401002017838**
2. Titel van het project: In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen
3. Titel van de NTS: In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
[REDACTED]
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 08-02-2017
Aanvraag compleet: 08-02-2017
In vergadering besproken: 20-02-2017
Termijnonderbreking van 22-02-2017 tot 02-03-2017
Aanpassing aanvraag: 02-03-2017
Advies aan CCD: zie datum brief
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
9. Correspondentie met de aanvrager
Datum vragen: 22-02-2017
Gestelde vragen en antwoorden:
 - De HEP's moeten concreter beschreven worden waarbij ook de tijdsduur vermeld wordt. De DEC is van mening dat de HEP's laat gesteld zijn en wil ze zodanig gehanteerd worden dat de MvO van de dieren "matig" niet overschrijdt.
In-ovo vaccinatie is niet pijnlijk, de gezondheid van de kulkens wordt dagelijks en vanaf challenge tot aan het einde van de proef 2x daags geobserveerd mbv een score lijst waarin in IBV ziekteverschijnselen (lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en ademhaling) staan vermeldt. Elk verschijnsel wordt beoordeeld met een geen (0), milde (1) of ernstige score (2). Het humane eindpunt wordt bereikt bij ernstige benauwdheid (score 2 ademhaling) OF bij een totale

DATUM
13 maart 2017

ONS KENNEN
AVD401002017838

PAGINA
2 van 4

score van ≥ 7 bij een tijdsduur van meer dan 2 opeenvolgende dagen.

- De DEC vraagt zich af of de sterfte in het ei als gevolg van verkeerd aanprikken (wat volgens de onderzoeker voelbaar is) verminderd kan worden door de foeten nogmaals aan te prikken.
Het aanprikken gebeurt met een speciale naald en er wordt van bovenaf geprikt (door luchtkamer en alantois holte). Het doel is om het embryo te injecteren, het raken van het embryo wordt gevoeld tijdens het injecteren maar het is niet te voelen of het embryo verkeerd geraakt wordt. Ervaring uit vorige proef: ongeveer [] van de embryo's zijn geïnjecteerd (+) en [] niet (-), hiervan is het vaccin in de amnion holte beland. Uitkomstpercentages (+) eieren [] en (-) eieren []
Het nogmaals proberen aan te prikken is niet mogelijk omdat juist het voelen ook injecteren betekent en dan zou het embryo een tweede dosis ontvangen. Overigens waren vrijwel alle gevaccineerde dieren (+ en - [])
- Ook wil de DEC weten of het mogelijk is om merkbaar verkeerd aangeprikte eieren direct uit het experiment te nemen en te koelen zodat de foeten niet uitkomen.
Zoals hierboven vermeldt is het niet te voelen of het embryo verkeerd geraakt wordt. Dus het uitsnemen van verkeerd aangeprikte eieren is niet mogelijk.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën in overeenstemming zijn met de hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Het directe doel is het bepalen van de minimale werkzame dosis van een vaccin waarbij voor langere tijd een goede bescherming optreedt tegen IB.
Het uiteindelijke doel is het verkrijgen van een optimaal werkend in-ovo vaccin ter bestrijding van IB bij kuikens met minder ongerief van de vaccinatie voor de dieren.
De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belanghebbenden en hun morele waarden in het project zijn:
 - Proefdieren: aantasting van welzijn en integriteit, met name voor de dieren die gechallenged worden wanneer het vaccin niet werkzaam blijkt te zijn en voor de ongevaccineerde controledieren.
 - Doeldieren: minder ongerief door vaccinatie
 - Pluimveehouder: economisch belang, arbeidsvreugde omdat vaccinatie niet meer in de stal hoeft te gebeuren
 - Onderzoeker/CRO: economisch belang
 - Farmaceutische Industrie: economische belang
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken. Opgemerkt wordt dat men met genetisch gemodificeerde vaccinkandidaten werkt.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn.
8. De DEC heeft vastgesteld dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. Het project is een vervolg op eerder uitgevoerd onderzoek. De gekozen strategie en experimentele aanpak kan in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling(en) binnen het kader van het project.

DATE

13 maart 2017

ONS KENNEMERK

AVD401002017838

PAGINA

3 van 4

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "licht" voor wat betreft de gevaccineerde dieren. De ongevaccineerde dieren zullen maximaal "matig" ongerief ondervinden. Het ongerief is in de ogen van de DEC realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit: bloedafname, toediening challenge via oogdruppeling en ziekteverschijnselen van IBV-infectie.
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan als gevolg van de proefbehandelingen. De DEC heeft gediscussieerd of de sterfte van de foeten in-ovo als aantasting van de integriteit gezien kan worden. Zij komt tot de conclusie dat de foeten in het ei niet als proefdier gezien worden in de zin der wet.
13. De DEC heeft vastgesteld dat, na aanpassing n.a.v. vragen van de DEC hierover, de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en dat goed is ingeschat welk percentage van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken.

3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Challenge is alleen mogelijk in het doeldier.
15. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. De onderzoeker heeft een substantieel % reservedieren aangevraagd. De DEC is van mening dat goed is onderbouwd is waarom dit noodzakelijk is (eisen van de Europese Pharmacopee en ervaringen uit eerder onderzoek). De DEC is van mening dat er geen mogelijkheden zijn om tot een vermindering van het aantal dieren te komen.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De onderzoeker heeft in de ogen van de DEC maximaal invulling gegeven aan verfijning door o.a. dieren 2x per dag te observeren een gevoelige test te gebruiken waardoor volstaan kan worden met een milde challenge-infectie. De DEC ziet geen mogelijkheden voor verdere verfijning.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De dieren worden van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven.
19. De dieren worden wel/niet gedood in het kader van het project. Post mortem wordt een cillostase test uitgevoerd. Deze test is een essentieel onderdeel van het onderzoek. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

NTS

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

DATUM
13 maart 2017

ONSREKENMERK
AVD401002017838

PAGINA
4 van 4

D. Ethische afweging

De centrale morele vraag van het project is: rechtvaardigt het onderzoek dat ertoe moet leiden dat een vaccin ontwikkeld wordt het ongerief van een beperkt aantal proefdieren. Het gaat hierbij om een vaccin dat minder ongerief geeft bij toediening en beter en langduriger werkt dan de huidige vaccins en dat daardoor grote aantallen soortgenoten gevrijwaard blijven van IB en de gevolgen ervan. In de afweging heeft de DEC geconstateerd dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. De DEC heeft meegewogen dat het onderzoek bijdraagt aan de ontwikkeling van een vaccin dat qua werkzaamheid en effectiviteit in potentie beter is dan bestaande vaccins. Als het project zijn doel bereikt dan heeft dit een substantiële bijdrage voor de waarden van gezondheid en welzijn van de dieren. Ook het economische belang voor de veehouder/sector is in die situatie substantieel. Daarnaast speelt voor de pluimveehouder mee dat de vaccinatie niet meer in de stal hoeft te gebeuren. De Onderzoeker/CRO en de farmaceutische industrie hebben beide een economische belang. De DEC heeft dit meegewogen als een beperkt belang. Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in het geding. Het gaat hier om een maximaal matige aantasting van welzijn, met name voor de dieren die gechallenged worden wanneer het vaccin niet werkzaam blijkt te zijn en voor de ongevaccineerde controledieren. De integriteit wordt in dit project niet sterker aangetast dan gebruikelijk bij het uitvoeren van een dierproef.

1. Op basis hiervan is de DEC van mening dat in het ongerief voor deze proefdieren te verdedigen is en dat er in dit stadium geen mogelijkheden zijn op het terrein van vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag. De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

E. Advies

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

Met vriendelijke groet,




secretaris DEC WUR



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002017838
Bijlagen
2

Datum 21 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 20 februari 2017. Het gaat om uw project "In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD401002017838. 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:

AVD401002017838

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
21 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002017838

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 40100
Naam instelling of organisatie: Stichting Wageningen Research
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: ██████████
KvK-nummer: 908104
Postbus: 59
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN
IBAN: NL10RABO0397066465
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Wageningen UR

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
21 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002017838

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [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 mei 2017
Geplande einddatum: 29 april 2022
Titel project: In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen
Titel niet-technische samenvatting: In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen
Naam DEC: DEC-WUR
Postadres DEC: Droevendaalsesteeg 4 6708 PB Wageningen
E-mailadres DEC: dec@wur.nl

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:
 Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:
 DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Wageningen
Datum: 20 februari 2017



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002017838
Bijlagen
2

Datum 21 februari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 21 februari 2017
Vervaldatum: 23 maart 2017
Factuurnummer: 170838
Ordernummer: WUR1037550

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002017838	€ 1.441,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD401002017838

Datum 23 maart 2017

Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 20 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen" met aanvraagnummer AVD401002017838. 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 drie bijlagen geeft u aan dat pijnbestrijding niet wordt toegepast terwijl dit wel wenselijk is. Kunt u onderbouwen waarom pijnbestrijding niet wordt toegepast?

In de drie bijlagen geeft u aan dat de dieren gehuisvest worden buiten een instelling van een vergunninghouder, maar u heeft de huisvesting niet verder beschreven of onderbouwd waarom deze dierproef buiten een instelling van een vergunninghouder wordt uitgevoerd en hoe u verzekert dat huisvesting en verzorging van de dieren adequaat gebeurt.

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Datum:

23 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD401002017838

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



Melding bijlagen

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

1 Uw Gegevens

Naam instelling: Stichting Wageningen Research

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD401002017838

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:

23 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD401002017838

3 Ondertekening

Naam:

Datum: - -

Handtekening:

Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

[REDACTED]

Aan: CCD
Onderwerp: AVD401002017838

CCD,

Hierbij de antwoorden in reactie op uw verzoek om aanvullende info (brief d.d. 23 maart) met betrekking tot project AVD4010020176838:

* Pijnbestrijding (H): stond wel in iVention, maar is in de opgestuurde versie weggefallen (blijkt fout van iVention systeem). In de nieuwe versie Description Animal Procedure (7) staat het antwoord weergegeven: "Omdat dit mogelijk de uitkomst van de proef beïnvloedt. De pijn zal ontstaan na de IBV challenge, bij het bereiken van het humane eindpunt worden de dieren direct geëuthanaseerd."

* Huisvesting (G): Antwoord verkeerd ingevuld, yes moet no zijn, is aangepast en weergegeven in de nieuwe versie 'Description Animal Procedure (7)'

De nieuwe versie Description Animal Procedure (7) is separaat per NetFTP opgestuurd

Met vriendelijke groet,
namens mevrouw Jelsma

[REDACTED]

Wageningen University & Research

[REDACTED]

www.wur.nl

[REDACTED]

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="451 1176 590 1198">Serial number</th> <th data-bbox="949 1176 1436 1198">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="451 1198 590 1308">1</td> <td data-bbox="949 1198 1436 1308">testen van de minimale dosering vaccin kandidaat voor bescherming in SPF kippen.</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	1	testen van de minimale dosering vaccin kandidaat voor bescherming in SPF kippen.
Serial number	Type of animal procedure					
1	testen van de minimale dosering vaccin kandidaat voor bescherming in SPF kippen.					

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.

De 19-daagse bebroede eieren worden *in-ovo* gevaccineerd met 2 verschillende doseringen van [redacted] IBV vaccin [redacted] tezamen met een placebo vaccinatie (1 controlegroep).

In totaal worden er op deze manier [redacted] kandidaat vaccins getest (1 kandidaat vaccin per experiment).

De *in-ovo* vaccinatie wordt uitgevoerd in een [redacted] dierruimte per groep en in dezelfde ruimte worden de eieren uitgebroed. Zodra de eieren uitkomen wordt het uitkomst percentage bepaald en de gezondheid van de kuikens wordt geïnspecteerd en worden ze in beide vleugels gemerkt met een uniek nummer per dier. De kuikens worden vervolgens gedurende 21 dagen dagelijks verzorgd en geobserveerd. Op de leeftijd van 21 dagen wordt een serum-bloedmonster afgenomen om de immuunstatus van het dier te bepalen. Tevens worden de dieren geïnfecteerd (challenge) met IBV virus via oogdruppeling. Na de challenge worden de dieren gedurende 5 dagen 2x per dag klinisch geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de kippen geëuthanaseerd en worden tijdens de sectie de trachea's (luchtpijp) microscopisch onderzocht (ciliostase test) zoals voorgeschreven in de Europese farmacopee (pg. 721). De aan- of afwezigheid van bewegende cilia (trilharen) in de trachea geven de mate van bescherming aan. Zijn de cilia intact dan is een gevaccineerd dier beschermd tegen het challenge virus. Bij de controle dieren die niet gevaccineerd zijn cilia niet meer intact. Via een score-systeem wordt de mate van bescherming vastgesteld.

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

De *in-ovo* vaccinatie wordt 1 maal toegepast, het vaccin wordt in het 19-daags bebroede ei gespoten bij voorkeur in het embryo (in minstens 50% van de eieren per groep). Indien de injectienaald het embryo niet kan bereiken (dat is te voelen) heeft dit tot gevolg dat het vaccin in de amnion holte zal terechtkomen. In voorgaande proeven leek er [redacted] waarin er [redacted] voorkwam bij de [redacted] eieren.

[redacted] van de eieren als [redacted]. Na de uitkomst worden de dieren dagelijks verzorgd en geobserveerd. Als de kuikens 21 dagen oud zijn wordt er een bloedmonster genomen om de antilichaamsrespons gericht tegen het vaccin-virus vast te stellen. Door randomisatie worden 20 dieren per groep geselecteerd voor de challenge met IBV virus, deze challenge wordt gedaan via oogdruppeling. De dieren worden vervolgens gedurende vijf dagen 2x daags verzorgd en klinische geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de dieren geëuthanaseerd.

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

In de Europese farmacopee Avian infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2) staat beschreven dat per vaccingroep niet minder dan 20 dieren moeten worden gebruikt voor het vaccinatie/challenge experiment.

Echter omdat hier begonnen wordt met bebroede eieren, is ervoor gekozen om met 30 eieren per groep te starten. Hiermee wordt ondervangen dat voor de uiteindelijke effectiviteitsstudie (challenge) te weinig kuikens beschikbaar zijn, waardoor het experiment ongeldig zou zijn. In ovo vaccinatie wordt veelvuldig toegepast en geeft weinig embryo verliezen. In een kleinschalig experiment moet er echter altijd rekening mee gehouden worden dat door toeval in een groep meer embryonale sterfte optreedt dan gemiddeld. Embryonale sterfte kan optreden als gevolg van toeval (niet gerelateerd aan de in ovo vaccinatie), maar ook door de in ovo vaccinatie (door het mechanische proces of als gevolg van het IBV vaccin). De bebroede eieren worden dagelijks geschouwd, dit betekent dat mbv een lamp wordt gekeken of het embryo nog leeft.

Ervaring uit eerdere proeven:

■ vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van ■ tot slechts ■
■ twee vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van ■
■ keer controle groep ■: uitkomstpercentages ■

Uitval tijdens opgroei-periode tot leeftijd 21 dagen varieerde van minimaal 2 tot maximaal 5 dieren per groep.

Euthanasie door randomisatie op dag van challenge:

Totaal zijn er in de geteste ■ groepen, ■ dieren geëuthanaseerd op 21 dagen leeftijd.

In geval van de groep met uitkomst van ■ en uitval van ■ dieren betekende het dat slechts ■ voor de challenge geëuthanaseerd moest worden.

Bovenstaande geeft aan dat een start met 30 eieren een realistische inschatting geeft om het beoogde aantal van 20 dieren voor challenge te behalen.

B. The animals

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

Er worden kuikens (leghennen of broilers) gebruikt die uit SPF eieren zijn uitgebroed.

Er worden maximaal 90 stuks bebroede eieren per experiment gebruikt. Het experiment bestaat uit ■ in twee groepen wordt het vaccin toegediend in twee verschillende doseringen en de derde groep betreft de ongevaccineerde ■ controle groep. In totaal zullen er op deze manier ■ vaccinkandidaten getest worden en dat betekent dus dat er in totaal ■ bebroede eieren gebruikt zullen worden. Indien alle eieren per experiment (=1 vaccin kandidaat) uitkomen is er sprake van 90 kippen (totaal van 3x30 eieren per groep). De challenge met het IBV virus op de leeftijd van 21 dagen wordt uitgevoerd op 20 dieren per groep. De overige dieren (surplus) worden door randomisatie uit de proef gehaald en geëuthanaseerd. De dieren die gechallengeed zijn zullen op een leeftijd van 26 dagen of eerder (indien ernstige kliniek) worden geëuthanaseerd.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Vervanging: kip is het doeldier, vervanging is niet mogelijk omdat er geen in-vitro systeem bestaat om bescherming aan te tonen. Vermindering: Er wordt uitgegaan van de Europese farmacopee infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2), waarin staat aangegeven dat er minimaal 20 dieren voor een vaccinatie/challenge experiment gebruikt moeten worden. Om te voorkomen dat het experiment ongeldig wordt door een te hoge embryonale sterfte en uitval na uitkomst wordt begonnen met 30 eieren. Bij uitval van 30% eieren/kuikens (ook een maat voor veiligheid van het vaccin) kan dan nog steeds de effectiviteit op een valide manier worden bepaald. Verfijning: De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

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

De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

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.

Er is geen sprake van herhaling van het testen van eenzelfde vaccin kandidaat. De uitvoering van de proef is als vermeldt in [REDACTED] echter nu wordt [REDACTED] kandidaat getest per experiment met [REDACTED] verschillende doseringen. Er worden maximaal [REDACTED] getest.

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.

Omdat dit mogelijk de uitkomst van de proef beïnvloedt. De pijn zal ontstaan na de IBV challenge, bij het bereiken van het humane eindpunt worden de dieren direct geëuthanaseerd.

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?

Embryonale sterfte, dit betekent het niet uitkomen van de eieren. IBV kliniek; Lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en benauwdheid

Explain why these effects may emerge.

Embryonale sterfte: mogelijk door in-ovo vaccinatie (door vaccin-virus of schade door injectienaald) of aspecifieke sterfte (geen duidelijke oorzaak)
IBV kliniek: Challenge met IBV virus

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

Door het toepassen van de humane eindpunten

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

In-ovo vaccinatie is niet pijnlijk, de gezondheid van de kuikens wordt dagelijks en vanaf challenge tot aan het einde van de proef 2x daags geobserveerd mbv een score lijst waarin in IBV ziekteverschijnselen (lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en ademhaling) staan vermeldt. Elk verschijnsel wordt beoordeeld met een geen (0), milde (1) of ernstige score (2). Het humane eindpunt wordt bereikt bij ernstige benauwdheid (score 2 ademhaling) OF bij een totale score van ≥ 7 bij een tijdsduur van meer dan 2 opeenvolgende dagen. Ervaring vorige dierproeven: [redacted] in de controle groep, [redacted] gescoord voor maximaal [redacted] dag in [redacted] dieren, in de overige [redacted] dieren geen kliniek gezien. In [redacted] vaccingroep [redacted], in de [redacted] dood [redacted] en [redacted] dier [redacted] dag [redacted]. Dus bovenstaande criteria zijn opgesteld voor een zeer hevige challenge, dit is niet onze ervaring in voorgaande proeven. De ciliositas test resulteerde in [redacted] in de controle groep, in tegenstelling tot de cilia van de gevaccineerde dieren [redacted]. Dus ondanks de [redacted] is er door deze test [redacted] tussen de beschermde en onbeschermde dieren.

Indicate the likely incidence.

Met inzicht uit vorige proeven: In de vaccin-groepen is de kans 0-20% en in de controle groep 0-50%

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).

De in-ovo vaccinatie: geen ongerief Bloedafname: licht ongerief Challenge: matig ongerief (bij toepassen humane eindpunten) Resultierend in een overall ongerief van matig

End of experiment

L. Method of killing

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.

Ciliostase test is een essentieel onderdeel van de proef

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

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

Yes

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure testen van de werkzaamheid in dieren met maternale immuniteit ook volgens de EP monograaf.

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In deze studie wordt de werkzaamheid getest in dieren met maternale immuniteit. Hiertoe worden 19-daagse bebroede eieren in-ovo gevaccineerd met meest geschikte vaccin-kandidaten uit studie 1 (maximaal 3) tezamen met een placebo vaccinatie (1 controlegroep).

De experimentele opzet is hetzelfde als studie 1. De *in-ovo* vaccinatie wordt uitgevoerd in een [redacted] dierruimte per groep en in dezelfde ruimte worden de eieren uitgebroed. Zodra de eieren uitkomen wordt het uitkomst percentage bepaald en de gezondheid van de kuikens wordt geïnspecteerd en worden ze in beide vleugels gemerkt met een uniek nummer per dier. De kuikens worden vervolgens gedurende 21 dagen dagelijks verzorgd en geobserveerd. Op de leeftijd van 21 dagen wordt een serum-bloedmonster afgenomen om de immunestatus van het dier te bepalen. Tevens worden de dieren geïnfecteerd (challenge) met IBV virus via oogdruppeling. Na de challenge worden de dieren gedurende 5 dagen 2x per dag klinisch geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de kippen geëuthanaseerd en worden tijdens de sectie de trachea's (luchtpijp) microscopisch onderzocht (ciliostase test) zoals voorgeschreven in de Europese farmacopee (pg. 721). De aan- of afwezigheid van bewegende cilia (trilharen) in de trachea geven de mate van bescherming aan. Zijn de cilia intact dan is een gevaccineerd dier beschermd tegen het challenge virus. Bij de controle dieren die niet gevaccineerd zijn cilia niet meer intact. Via een score-systeem wordt de mate van bescherming vastgesteld.

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

De in-ovo vaccinatie wordt 1 maal toegepast, het vaccin wordt in het 19-daags bebroede ei gespoten bij voorkeur in het embryo (In minstens [redacted] Indien de injectienaald het embryo niet kan bereiken (dat is te voelen) is de consequentie dat het vaccin in de amnion holte zal worden gespoten. In voorgaande proeven leek er een [redacted] waarin er [redacted] voorkwam bij de [redacted] eieren. [redacted] van de eieren als [redacted]

Na de uitkomst worden de dieren dagelijks verzorgd en geobserveerd. Als de kuikens 21 dagen oud zijn wordt er een bloedmonster genomen om de antilichaamsrespons gericht tegen het vaccin-virus vast te stellen. Door randomisatie worden 20 dieren per groep geselecteerd voor de challenge met IBV virus, deze challenge wordt gedaan via oogdruppeling. De dieren worden vervolgens gedurende vijf dagen 2x daags verzorgd en klinische geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de dieren geëuthanaseerd.

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

In de Europese farmacopee Avian infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2) staat beschreven dat per vaccingroep niet minder dan 20 dieren moeten worden gebruikt voor het vaccinatie/challenge experiment. Echter omdat hier begonnen wordt met bebroede eieren, is ervoor gekozen om met 30 eieren per groep te starten. Hiermee wordt ondervangen dat voor de uiteindelijke effectiviteitsstudie (challenge) te weinig kuikens beschikbaar zijn, waardoor het experiment ongeldig zou zijn. In ovo vaccinatie wordt veelvuldig toegepast en geeft weinig embryo verliezen. In een kleinschalig experiment moet er echter altijd rekening mee gehouden worden dat door toeval in een groep meer embryonale sterfte optreedt dan gemiddeld. Embryonale sterfte kan optreden als gevolg van toeval (niet gerelateerd aan de in ovo vaccinatie), maar ook door de in ovo vaccinatie (door het mechanische proces of als gevolg van het IBV vaccin). De bebroede eieren worden dagelijks geschouwd, dit betekent dat mbv een lamp wordt gekeken of het embryo nog leeft.

Ervaring uit eerdere proeven:

■ vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van ■ tot slechts ■

■ twee vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van ■

keer controle groep ■; uitkomstpercentages ■

Uitval tijdens opgroei-periode tot leeftijd 21 dagen varieerde van minimaal 2 tot maximaal 5 dieren per groep.

Euthanasie door randomisatie op dag van challenge:

Totaal zijn er in de geteste 6 groepen, ■ dieren geëuthanaseerd op 21 dagen leeftijd.

In geval van de groep met uitkomst van ■ en uitval van ■ betekende het dat ■ voor de challenge geëuthanaseerd moest worden.

Bovenstaande geeft aan dat een start met 30 eieren een realistische inschatting geeft om het beoogde aantal van 20 dieren voor challenge te behalen.

B. The animals

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

Er worden kuikens (leghennen of broilers) gebruikt die uit commerciële eieren zijn uitgebroed. De moeder-flock wordt getest op aanwezigheid van antilichamen tegen infectieuze bronchitis (dit is een selectie criterium voor het gebruik van de eieren voor de proef). Er worden maximaal ■ stuks bebroede eieren gebruikt, dit betekent in totaal ■ en ■. De controle groep bestaat uit ■ eieren omdat er ■ eieren gereserveerd worden voor het bepalen van de immunusstatus van deze dieren (maternale antilichamen tegen IBV). Na uitkomst zullen er ■ kuikens na het nemen van de bloedmonsters niet deelnemen aan de proef en worden geëuthanaseerd. Er worden dus ■ eieren uitgebroed alleen voor bloedafname. De dierproef gaat verder met ■ eieren/kuikens per groep.

De challenge met het IBV virus op de leeftijd van 21 dagen wordt uitgevoerd op 20 dieren per groep. De overige dieren (surplus*) worden gerandomiseerd uit de proef gehaald en geëuthanaseerd.

De dieren die gechallengeed zijn zullen op een leeftijd van 26 dagen of eerder (indien ernstige kliniek) worden geëuthanaseerd. Tijdens sectie wordt de bescherming tegen de challenge getest op trachea's adhv de cillioestase test.

* Surplus dieren: Er zal een evaluatie plaatsvinden na het eerste experiment (bijlage 1) om te bepalen of het aantal surplus dieren (max ■ per groep) naar beneden bijgesteld kan worden. Dit zal gebeuren in overleg met de IVD.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Vervanging: kip is het doeldier, vervanging is niet mogelijk omdat er geen In-vitro systeem bestaat om bescherming aan te tonen. Vermindering: Er wordt uitgegaan van de Europese farmacopee infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2), waarin staat aangegeven dat er minimaal 20 dieren voor een vaccinatie/challenge experiment gebruikt moeten worden. Om te voorkomen dat het experiment ongeldig wordt door een te hoge embryonale sterfte en uitval na uitkomst wordt begonnen met 30 eieren. Bij uitval van 30% eieren/kuikens (ook een maat voor veiligheid van het vaccin) kan dan nog steeds de effectiviteit op een valide manier worden bepaald. Verfijning: De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

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

De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te

pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

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.

Er is geen sprake van herhaling van het testen van eenzelfde vaccin kandidaat. De uitvoering van de proef is als vermeldt in [REDACTED] echter nu worden er maximaal [REDACTED] kandidaten getest en zijn de kuikens afkomstig uit conventionele bebroede eieren.

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.

Omdat dit mogelijk de uitkomst van de proef beïnvloedt. De pijn zal ontstaan na de IBV challenge, bij het bereiken van het humane eindpunt worden de dieren direct geëuthanaseerd.

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?

Embryonale sterfte, dit betekent het niet uitkomen van de eieren. IBV kliniek; Lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en benauwdheid

Explain why these effects may emerge.

Embryonale sterfte: mogelijk door in-ovo vaccinatie (door vaccin-virus of schade door injectienaald) of aspecifieke sterfte (geen duidelijke oorzaak)
IBV kliniek: Challenge met IBV virus

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

Door het toepassen van de humane eindpunten

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

In-ovo vaccinatie is niet pijnlijk, de gezondheid van de kuikens wordt dagelijks en vanaf challenge tot aan het einde van de proef 2x daags geobserveerd mbv een score lijst waarin in IBV ziekteverschijnselen (lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en benauwdheid) staan vermeldt. Elk verschijnsel wordt beoordeeld met een geen (0), milde (1) of ernstige score (2). Het humane eindpunt wordt bereikt bij ernstige benauwdheid (score 2 ademhaling) OF bij een totale score van ≥ 7 bij een tijdsduur van meer dan 2 opeenvolgende dagen.

Ervaring vorige dierproeven: [redacted] kliniek in de controle groep, [redacted] gescoord voor maximaal [redacted] dag in [redacted] dieren, in de overige [redacted] dieren geen kliniek gezien. In [redacted] vaccingroep [redacted], in de [redacted] dood [redacted] en [redacted] dier [redacted] dag [redacted]. Dus bovenstaande criteria zijn opgesteld voor een zeer hevige challenge, dit is niet onze ervaring in voorgaande proeven. De ciliostasis test resulteerde in [redacted] in de controle groep, in tegenstelling tot de cilia van de gevaccineerde dieren [redacted]. Dus ondanks de [redacted] is er door deze test [redacted] tussen de beschermde en onbeschermde dieren.

Indicate the likely incidence.

Met inzicht uit vorige proeven: In de vaccin-groepen is de kans 0-20% en in de controle groep 0-50%

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).

De in-ovo vaccinatie: geen ongerief Bloedafname: licht ongerief Challenge: matig ongerief (bij toepassen humane eindpunten) Resultierend in een overall ongerief van matig

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.

Ciliostase test is een essentieel onderdeel van de proef

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

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

Yes

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	40100				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Wageningen Research				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="456 1171 592 1189">Serial number</th> <th data-bbox="954 1171 1449 1296">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="456 1193 592 1211">3</td> <td data-bbox="954 1193 1449 1296">testen van de duur van de bescherming, met een challenge op 6 weken na vaccinatie en een challenge 8 weken na vaccinatie.</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	3	testen van de duur van de bescherming, met een challenge op 6 weken na vaccinatie en een challenge 8 weken na vaccinatie.
Serial number	Type of animal procedure					
3	testen van de duur van de bescherming, met een challenge op 6 weken na vaccinatie en een challenge 8 weken na vaccinatie.					

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In dit experiment wordt de duur van bescherming/immunitet onderzocht aan de hand van een challenge op 6 weken leeftijd en op 8 weken leeftijd, dit in tegenstelling tot de eerdere experimenten waarbij de challenge op een leeftijd van 3 weken uitgevoerd werd.

De verdere proefopzet is verder gelijk aan studie 1.

Er worden 19-daagse bebroede eieren in-ovo gevaccineerd met de meest geschikte vaccin-kandidaten uit studie 1 en 2 tezamen [REDACTED] met een placebo vaccinatie (1 controlegroep).

De *in-ovo* vaccinatie wordt uitgevoerd in een [REDACTED] dierruimte per groep en in dezelfde ruimte worden de eieren uitgebroed. Zodra de eieren uitkomen wordt het uitkomst percentage bepaald en de gezondheid van de kuikens wordt geïnspecteerd en worden ze in beide vleugels gemerkt met een uniek nummer per dier. De kuikens worden vervolgens gedurende 21 dagen dagelijks verzorgd en geobserveerd. Op de leeftijd van 21 dagen wordt een serum-bloedmonster afgenomen om de immuunstatus van het dier te bepalen. Tevens worden de dieren geïnfecteerd (challenge) met IBV virus via oogdruppeling. Na de challenge worden de dieren gedurende 5 dagen 2x per dag klinisch geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de kippen geëthanaseerd en worden tijdens de sectie de trachea's (luchtpijp) microscopisch onderzocht (ciliostase test) zoals voorgeschreven in de Europese farmacopee (pg. 721). De aan- of afwezigheid van bewegende cilia (trilharen) in de trachea geven de mate van bescherming aan. Zijn de cilia intact dan is een gevaccineerd dier beschermd tegen het challenge virus. Bij de controle dieren die niet gevaccineerd zijn cilia niet meer intact. Via een score-systeem wordt de mate van bescherming vastgesteld.

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

De in-ovo vaccinatie wordt 1 maal toegepast, het vaccin wordt in het 19-daags bebroede ei gespoten bij voorkeur in het embryo (in minstens 50%). Indien de injectienaald het embryo niet kan bereiken (dat is te voelen) is de consequentie dat het vaccin in de amnion holte zal worden gespoten. In voorgaande proeven leek er [REDACTED] waarin er [REDACTED] voorkwam bij de [REDACTED] eieren. [REDACTED]

Na de uitkomst worden de dieren dagelijks verzorgd en geobserveerd. Als de kuikens 21 dagen oud zijn wordt er een bloedmonster genomen om de antilichaamsrespons gericht tegen het vaccin-virus vast te stellen. Door randomisatie worden 20 dieren per groep geselecteerd voor de challenge met IBV virus, deze challenge wordt gedaan via oogdruppeling. De dieren worden vervolgens gedurende vijf dagen 2x daags verzorgd en klinische geobserveerd. Vijf dagen na de challenge worden de dieren geëthanaseerd.

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

In de Europese farmacopee Avian Infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2) staat beschreven dat per vaccingroep niet minder dan 20 dieren moeten worden gebruikt voor het vaccinatie/challenge experiment. Echter omdat hier begonnen wordt met bebroede eieren, is ervoor gekozen om met 30 eieren per groep te starten. Hiermee wordt ondervangen dat voor de uiteindelijke effectiviteitsstudie (challenge) te weinig kuikens beschikbaar zijn, waardoor het experiment ongeldig zou zijn. In ovo vaccinatie wordt veelvuldig toegepast en geeft weinig embryo verliezen. In een kleinschalig experiment moet er echter altijd rekening mee gehouden worden dat door toeval in een groep meer embryonale sterfte optreedt dan gemiddeld. Embryonale sterfte kan optreden als gevolg van toeval (niet gerelateerd aan de in ovo vaccinatie), maar ook door de in ovo vaccinatie (door het mechanische proces of als gevolg van het IBV vaccin). De bebroede eieren worden dagelijks geschouwd, dit betekent dat mbv een lamp wordt gekeken of het embryo nog leeft.

Ervaring uit eerdere proeven:

■ vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van ■
■ twee vaccin-kandidaten: uitkomstpercentages van ■
■ keer controle groep (■ uitkomstpercentages beide ■
Uitval tijdens opgroei-periode tot leeftijd 21 dagen varieerde van minimaal 2 tot maximaal 5 dieren per groep.

Euthanasie door randomisatie op dag van challenge:

Totaal zijn er in de geteste ■ groepen, ■ dieren geëuthanaseerd op 21 dagen leeftijd.
In geval van de groep met uitkomst van ■ en uitval van ■ dieren betekende het dat ■ voor de challenge geëuthanaseerd moest worden.

Bovenstaande geeft aan dat een start met 30 eieren een realistische inschatting geeft om het beoogde aantal van 20 dieren voor challenge te behalen.

B. The animals

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

Er worden kuikens (leghennen of broilers) gebruikt die uit SPF eieren zijn uitgebroed.

Er worden maximaal 90 stuks bebroede eieren per experiment gebruikt. Het experiment bestaat uit 3 groepen eieren (30 per groep), in twee groepen wordt het vaccin toegediend en de derde groep betreft de ongevaccineerde ■ controle groep, de challenge vindt plaats op twee verschillende tijdstippen. In totaal zullen er op deze manier ■ kandidaten getest worden en dat betekent dus dat er in totaal ■ bebroede eieren gebruikt zullen worden.

Indien alle eieren per experiment ■ uitkomen is er sprake van 90 kippen (totaal van 3x30 eieren per groep). De challenge met het IBV virus op de leeftijd van 21 dagen wordt uitgevoerd op 20 dieren per groep. De overige dieren (surplus*) worden door randomisatie uit de proef gehaald en geëuthanaseerd. De dieren die gechallengeed zijn zullen op een leeftijd van 26 dagen of eerder (Indien ernstige kliniek) worden geëuthanaseerd.

* Surplus dieren: Er zal een evaluatie plaatsvinden na het eerste experiment (bijlage 1) om te bepalen of het aantal surplus dieren (max 10 per groep) naar beneden bijgesteld kan worden. Dit zal gebeuren in overleg met de IVD.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Are the previous or proposed animal procedures classified as 'severe'?

No

Yes > Provide specific justifications for the re-use of these animals during the procedures.

D. Replacement, reduction, refinement

Describe how the principles of replacement, reduction and refinement were included in the research strategy, e.g. the selection of the animals, the design of the procedures and the number of animals.

Vervanging: kip is het doeldier, vervanging is niet mogelijk omdat er geen in-vitro systeem bestaat om bescherming aan te tonen. Vermindering: Er wordt uitgegaan van de Europese farmacopee infectious bronchitis vaccine (live) pg. 721 (2.4-3-1/2), waarin staat aangegeven dat er minimaal 20 dieren voor een vaccinatie/challenge experiment gebruikt moeten worden. Om te voorkomen dat het experiment ongeldig wordt door een te hoge embryonale sterfte en uitval na uitkomst wordt begonnen met 30 eieren. Bij uitval van 30% eieren/kuikens (ook een maat voor veiligheid van het vaccin) kan dan nog steeds de effectiviteit op een valide manier worden bepaald. Verfijning: De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

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

De dieren worden gehouden onder zo gunstig mogelijke omstandigheden, met een lichtregime, temperatuur- en vochtigheidsregulatie die hiervoor worden geoptimaliseerd. De dieren worden op de vloer met houtkrullen gehuisvest, elke diergroep heeft een warmtelamp en touwbundels om aan te pikken tot hun beschikking. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van een veel gebruikt scoringssysteem voor klinische verschijnselen, op basis waarvan ook het humane eindpunt wordt bepaald en dieren niet onnodig lijden.

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.

Er is geen sprake van herhaling van het testen van eenzelfde vaccin kandidaat. De uitvoering van de proef is als vermeldt in [REDACTED] echter nu wordt [REDACTED] kandidaat getest per experiment met twee verschillende challenge tijdstippen. Er worden maximaal [REDACTED] kandidaten getest.

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.

Omdat dit mogelijk de uitkomst van de proef beïnvloedt. De pijn zal ontstaan na de IBV challenge, bij het bereiken van het humane eindpunt worden de dieren direct geëuthanaseerd.

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?

Embryonale sterfte, dit betekent het niet uitkomen van de eieren. IBV kliniek; Lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvoeling, waterige ogen en benauwdheid

Explain why these effects may emerge.

Embryonale sterfte: mogelijk door in-ovo vaccinatie (door vaccin-virus of schade door injectienaald) of aspecifieke sterfte (geen duidelijke oorzaak)
IBV kliniek: Challenge met IBV virus

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

Door het toepassen van de humane eindpunten

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

In-ovo vaccinatie is niet pijnlijk, de gezondheid van de kuikens wordt dagelijks en vanaf challenge tot aan het einde van de proef 2x daags geobserveerd mbv een score lijst waarin in IBV ziekteverschijnselen (lusteloos, diarree, hoesten, niezen, neus-uitvloeiing, waterige ogen en benauwdheid) staan vermeldt. Elk verschijnsel wordt beoordeeld met een geen (0), milde (1) of ernstige score (2). Het humane eindpunt wordt bereikt bij ernstige benauwdheid (score 2 ademhaling) OF bij een totale score van ≥ 7 bij een tijdsduur van meer dan 2 opeenvolgende dagen. Ervaring vorige dierproeven: [redacted] kliniek in de controle groep, [redacted] gescoord voor maximaal [redacted] dag in [redacted] dieren, in de overige [redacted] dieren geen kliniek gezien. In [redacted] vaccingroep [redacted] in de [redacted] dood [redacted] er [redacted] dag [redacted]. Dus bovenstaande criteria zijn opgesteld voor een zeer hevige challenge, dit is niet onze ervaring in voorgaande proeven. De ciliositastest resulteerde in [redacted] in de controle groep, in tegenstelling tot de cilia van de gevaccineerde dieren [redacted]. Dus ondanks de [redacted] is er door deze test [redacted] tussen de beschermde en onbeschermde dieren.

Indicate the likely incidence.

Met inzicht uit vorige proeven: In de vaccin-groepen is de kans 0-20% en in de controle groep 0-50%

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).

De in-ovo vaccinatie: geen ongerief Bloedafname: licht ongerief Challenge: matig ongerief (bij toepassen humane eindpunten) Resultierend in een overall ongerief van matig

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.

Ciliostase test is een essentieel onderdeel van de proef

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



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Wageningen Research

Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD401002017838
Bijlagen
1

Datum 10 april 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 20 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen" met aanvraagnummer AVD401002017838. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 13 maart 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Er is uitgelegd waarom geen pijnbestrijding wordt toegepast en het antwoord bij vraag G van de verschillende bijlagen is nu correct ingevuld.

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 "In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 mei 2017 tot en met 29 april 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC-WUR. Dit advies is opgesteld op 13 maart 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de

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

Datum:
10 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD401002017838

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:


Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Stichting Wageningen Research
Adres: Postbus 59
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN
Deelnemersnummer: 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 mei 2017 tot en met 29 april 2022, voor het project "In ovo vaccinatie infectieuze bronchitis virus in kippen" met aanvraagnummer AVD401002017838, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-WUR. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende beschelden:

- 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 27 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 13 maart 2017, ontvangen op 13 maart 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 13 maart 2017

Aanvraagnummer:
AVD401002017838

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 testen van de minimale dosering vaccin kandidaat voor bescherming in SPF kippen.				360 eieren, hiervan worden 240 kippen geselecteerd voor challenge
	Kippen /	240	100% Matig	
3.4.4.2 testen van de werkzaamheid in dieren met maternale immuniteit ook volgens de EP monograaf.				130 eieren, hiervan worden 90 kippen geselecteerd voor challenge of bloedafname
	Kippen /	90	100% Matig	
3.4.4.3 testen van de duur van de bescherming, met een challenge op 6 weken na vaccinatie en een challenge 8 weken na vaccinatie.				270 eieren, hiervan worden 180 kippen geselecteerd voor challenge
	Kippen /	180	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.

Aanvraagnummer:
AVD401002017838

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:
AVD401002017838

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 goedkeuring 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:
AVD401002017838

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 W17-09									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2017842								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud				x			x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven oud				x			x	
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
8	Reactie aanvulling aanvraag				x		x	x	
9	Projectvoorstel nieuw				x			x	
10	Bijlage beschrijving dierproeven nieuw				x			x	
11	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
12	Advies CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x	x	

20 MRT 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? <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 11800	
		<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	Academic Medical Center Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	3 4 3 3 6 2 7 7 7
		Straat en huisnummer	Meibergdreef 31
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Postbus	
		Postcode en plaats	1105AZ Amsterdam
		IBAN	NL68RABO0136166741
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC
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	Principal Investigator/Onderzoeker
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	@amc.uva.nl
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	laboratorium Analist
		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 | 0 1 . 0 6 . 2 0 1 7 |
| Einddatum | 0 1 . 0 6 . 2 0 2 2 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Zenuwprickeling als therapie tegen chronisch darmontsteking ziekten
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-----------------|
| Naam DEC | DEC AMC |
| Postadres | Meibergdreef 31 |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035.00 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
-

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 Amsterdam

Datum 17 - 03 - 2017

Handtekening [REDACTED]



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de 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.
-

This project concerns fundamental and applied research questions.

The central hypothesis of this study is that intervening with neuronal innervation of lymphoid organs affects immune responses that are important in chronic inflammatory diseases (termed Immune-Mediated Inflammatory Diseases (IMIDs)). These responses include events such as lymphocyte trafficking and immune cell activation through pattern recognition receptors.

General goals of the research are to test and validate neuronal intervention techniques (i.e. denervation and stimulation) to treat chronic inflammatory diseases, such as Inflammatory Bowel Disease (IBD, or colitis, but we will refer to IBD for clarity throughout this text).

Rationale for this project:

Modulation of vagus nerve activity by stimulating the vagal nerve at cervical or subdiaphragmatic level has been demonstrated to affect immune responses in vivo: stimulation reduced systemic and local inflammation (Borovikova et al, Nature 2001; deJonge et al, Nat Immunol 2005), whereas denervation augments inflammation (Oliver et al, Eur J Immunol 2016). The mechanism underlying neuro-immune modulation is unclear and it is believed that a better understanding will allow novel treatment of IBD (reviewed in Willemze et al, Nat Rev Gastro 2015). Nerve activity can affect immune responses because of the neurotransmitter receptors that are expressed on immune cells. As lymphoid organs are intensely innervated by particularly sympathetic fibers, nerve stimulation can have broad immune modulating effects relevant for IBD pathogenesis, even without the need for direct innervation of inflamed tissue. Neurotransmitter receptor activation affects multiple immune cell functions, such as cell trafficking to lymphoid organs (Kanai et al, J Exp Med 2015), cytokine production, and pathogen phagocytosis and killing. All of these are relevant for IBD pathogenesis. Clinical trials of nerve stimulation to reduce inflammation are already underway (Bonaz et al, Neurogastro and Mot 2016) and are well received among patients (Zitnik, Ann Rheum Dis. 2011), underscoring the safety, feasibility and societal urgency of nerve stimulation using implantable devices to reduce inflammatory responses, i.e. the topic of this project.

For this project we choose IBD as an immune mediated disease for the reason that: 1) IBD is a relatively prevalent diseases for which a great unmet need for treatment exists, 2) clinical trials of vagal nerve stimulation have already been performed in IBD (clinical trial NCT02311660), (and rheumatoid arthritis; clinical trial NCT01552941) and show efficacy in ameliorating disease likely via reduction of macrophage TNF release (neutralizing TNF using anti-TNF is an end point therapy for these patients), 3) well established rat and mouse models for IBD exist. The latter supports the societal significance and potential clinical application of the proposed project.

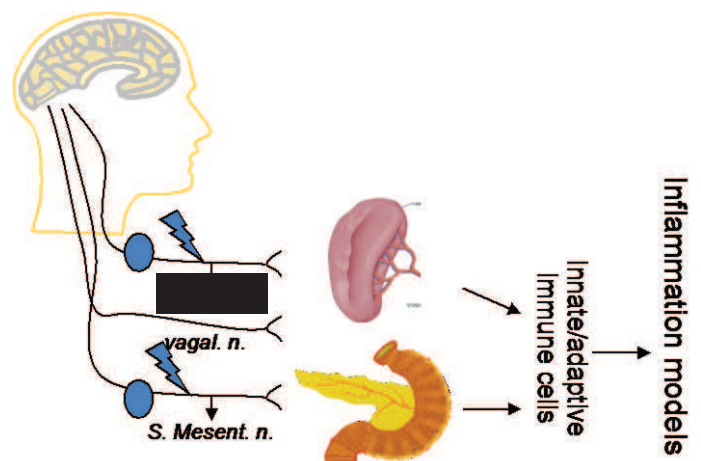
Our previous work in this area (Nijhuis et al, PLOS ONE 2013) and that of others (Martelli et al, J Physiol 2014) led us to assume that not only the vagal (parasympathetic) nerve, but also nerves of the sympathetic system are able to mediate immune modulation. In particular, nerves projecting to the [REDACTED] (Kanai et al, J Exp Med 2014) may mediate the modulation of the immune response by the vagus nerve. This was concluded from studies where [REDACTED] (removal of the

█ abolishes the effect of vagal nerve stimulation (Ji et al, Muc Immunol 2014). Moreover, sympathetic neurotransmitters are more immune-modulatory than parasympathetic neurotransmitters (Nijhuis et al, PLOS ONE 2013). These data suggest that vagal nerve stimulation indirectly stimulates █ innervation (indirectly, because no direct connection in the coeliac plexus between vagus nerve and █ innervation was ever demonstrated (Martelli et al, Exp Physiol 2016), although vagal fibers may reach the █ (Buijs et al, PLOS ONE 2008). Irrespective, vagus nerve stimulation has very pleiotropic effects because of the many organs innervated by the vagal nerve. This project's aim is to show that direct stimulation of sympathetic nerve bundles to the █, or to the intestine, is a more effective approach than vagus nerve stimulation.

Nerve fibers to the █ are organized around the █, in a plexus around the artery. We will refer to this plexus as the █. Similar to █ nerve stimulation, stimulating the output of the sympathetic innervation of the intestine, including intestinal lymphoid tissue via the **mesenteric nerve plexus** that surrounds the mesenteric artery, may be effective in the treatment of IBD. Sympathetic nerves that innervate immune cells in intestinal lymphoid tissue and mucosa can probably reduce IBD (reviewed in Willemze et al, Nat Rev Gastro 2015). Notably, the █ and mesenteric lymphoid organs jointly mediate immune activation in IBD. See for a schematic illustration of neural routes Fig 1.

Because the neuro-modulatory intervention appears to be relevant for the therapy of IBD, we have designed nerve "cuffs" (devices that enclose the nerve to allow electrical activation of the nerve fibers) that can be implanted (see Fig 2 for an illustration of the cuffs). Such cuffs can also be used to stimulate the nerve plexus and include the artery that is attached to it, as described above. Our industrial partner GlaxoSmithKline Bioelectronics (now Galvani Bioelectronics) has the intention to bring such devices to the market for treatment and, therefore, supports this research.

Fig. 1. The proposed experimental setup. Specific nerves will be denervated or stimulated to affect chronic inflammatory disease.



The choice for rat and mouse experiments.

We have developed nerve cuffs to fit on the mesenteric, vagal, and █ nerves over the past years. Because these initial nerve cuffs were relatively large and required a direct connection with external impulse generators, we used rats to implant the cuffs and test their ability to reduce IBD. In these experiments, chronically implanted electrodes were attached to adaptors that were cemented on the head of the rat to allow daily stimulation without the need for anesthesia. These implanted devices delivered proper pulses to the targeted nerve for over 21 days. The nature of electrical stimulation of the nerve bundle (i.e. the settings of the impulse generator) is important for the response to optimize the ratio of the desired (anti-inflammatory) and unwanted effects (e.g. altered perfusion of the organ). Because of our experience with the rat IBD model, stimulation parameters such as impulse frequency (1-20 Hz), applied current (10-200 μ A), and pulse duration (10-1000 μ sec) can be optimized without the need for first adapting the system to the experimental animal (a mouse is 10x smaller than a rat).

Rat models for IBD are less well developed. In contrast, various mouse models for IBD are available to better study aspects of IBD that are relevant to human IBD (a discussion of rats and mice as experimental models for IBD can be found in te Velde et al (IBD 2007) and Zeeff et al (IBD 2016)). Furthermore, mouse models offer additionally the availability of genetically modified strains that allow intervention with the expression of specific genes (e.g. neurotransmitters and their receptors) and the

tracing of cells. Moreover, more reagents for analyses, such as antibodies for complex FACS sorting panels, are available for mice. These complex FACS sorting experiments are necessary to identify which cells respond to nerve stimulation in the targeted organ. We, therefore, plan to switch to mouse models for IBD once we have characterized the electrical settings and responses of the implanted cuffs in rats.

Summarizing, we aim to:

- 1) Optimize the implantation and stimulation protocol for nerve bundles (mesenteric, and vagus nerves) in rat, extending earlier work;
- 2) Test the proof-of-concept of the efficacy of nerve bundle stimulation to reduce disease in rat models of IBD;
- 3) Implement the use of smaller, more appropriate, cuffs in mouse models of IBD that will allow us to better understand the mode of action and thus improve their efficacy by targeting the specific mechanisms that are responsible for the effects. Such implementation also requires smaller head mounts, with which we have already experience via working with our industry partner in this project.

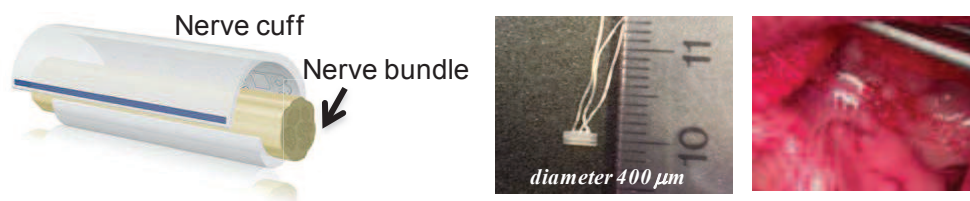


Fig 2. The implanted cuff electrode that will be used for this research. Left panel: nerve cuff, middle panel: illustration of the cuff and its size. Size ranges of 100-500 micrometer will be used depending on nerve diameter. Right panel: illustration of a nerve cuff (prototype) that we plan to use to electrically stimulate a nerve bundle (or plexus) (example: the splenic nerve plexus around the splenic artery).

Rat IBD models. We have experience with IBD models in rats and mice. In rats, we will use the DSS (Dextran Sulphate Sodium)-induced IBD model. In this model DSS is administered via the drinking water and causes damage to the epithelial layer of the colon that, in turn, causes an innate immune cell-driven response in the underlying mucosa leading to IBD.

Mouse IBD models. In contrast to the rat model, mouse models for IBD, including acute and chronic DSS-induced colitis, 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)-induced colitis (TNBS is a hapten that causes a T-cell-driven colitis), and CD45Rb^{high} transfer colitis (transfer of pathogenic T-cells to an immune-compromised host) allow molecular analyses of the immune responses.

Why testing of different mouse models for IBD? The etiology for human IBD (Ulcerative colitis nor Crohn's Disease) is not clear. Maybe for that reason, no specific model human IBD exists. However, the different rat/mouse models described in this project allow us to study different aspects of human IBD, for instance the DSS model is driven by innate pathways, the Tcell transfer model reflects a T cell driven IBD. Such multiple analyses allow modeling of clinically relevant aspects of human IBD, such as the involvement of innate and adaptive immune cells, ulcer and wound healing, barrier function, and involvement of cytokines such as TNF. The combination of mouse models of colitis is, therefore, well suited to study the mechanisms by which neuronal stimulation affects colitis.

It is important to note that these models are very dependent on the microbial status of the animal facility. As the AMC animal facility is just reconstructed and will be re-colonized from mice lines re-derived from other breeders, we need to optimize the conditions for the colitis models. This holds for the acute and chronic DSS-induced colitis, TNBS- induced colitis, and CD45rbhigh induced colitis.

Denervation and stimulation of nerve bundles in IBD models. Specific cuff electrodes to stimulate vagus nerve, and the [redacted] and mesenteric plexus in the rat will be used (Fig 2). Nerve activity will be blocked via surgical denervation. Stimulation and denervation of nerves is anticipated to ameliorate and augment inflammation, respectively, because of the anti-inflammatory effects of vagus nerve stimulation in septic models. However, amelioration of inflammatory disease by nerve activation is not always evident; inflammation involves many actors beyond cytokines, and it will also be relevant to reduce

neuronal activity to achieve modulation of the course of disease, such as shown for modulation of inflammation via the carotid body, which requires inhibition of nerve activity (Sacramento et al, 2016). So the combination of nerve denervation/stimulation will allow a full understanding of the modulation of the inflammatory process, and therefore we include stimulation and denervation experiments in this project. In addition, stimulation of different nerve bundles innervating lymphoid organs, i.e. those in the gut or [REDACTED], or stimulation of the vagus nerve, may be effective in reducing IBD because a general intervention in the immune response is anticipated.

Optimization of the electrical stimulation in disease models. The protocol for electrical stimulation of the nerve bundle needs to be optimized for current, voltage, and pulse duration and frequency. In particular, we need to quantify and optimize the electrical signal delivered to the nerve bundle in its efficacy to affect immune cell activation, such as cytokine and adhesion molecule expression. Therefore the strategy of this project is to optimize the surgery, pulse choice etc in a rat model, before moving on to mouse models, as outlined in Fig 3.

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?

The central research question is whether intervention with the function of (para)sympathetic nerve bundles can affect the course and pathogenesis of IBD.

Specific research questions:

1. What is the efficacy of selective stimulation of vagal nerve bundle (parasympathetic), mesenteric plexus (sympathetic), or [REDACTED] (sympathetic) on the course of IBD. We will use nerve denervation by surgical techniques to show the opposite effect of nerve stimulation.
2. What is the mechanism of action of the intervention (experiments in mouse models of IBD).

Feasibility of the studies.

Given our prior work and experience with the surgery, the proposed work is feasible within the 5 years timeline. Although many mechanistic questions around neural immunomodulation remain to be answered even following this project, proof of principle of nerve stimulation/denervation to modulate inflammation can be provided in the project time. It should be noted that strict mechanistic experiments, such as neurotransmitter receptor functions and lymphocyte trafficking, can be subsequently addressed in in vitro experiments.

The team (2 FTE lab technicians and 2 postdocs) is well trained in animal surgery. GSK Bioelectronics will take care of the nerve cuffs and stimulators.

3.3 Belang

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

Societal interest: Chronic disabling conditions associated with IBD adversely affect patients in terms of physical suffering and pain, impaired function, and diminished quality of life. These persistent relapsing diseases have a significant influence on individual employment status and work-related productivity. In addition, IBD represents a sizable burden on society due to high healthcare and non-healthcare related costs. IBD, which comprises Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), affects about 0.1% of the Western population. IBD affects youth at their prime of life, causing diarrhea, intestinal bleeding, and severe gut discomfort.

So-called biologicals (e.g. monoclonal antibodies and recombinant proteins directed against pro-inflammatory cytokines (like infliximab), or anti-integrin (vedoluzimab) have been demonstrated as very effective. However, none of the novel therapies has induced a lasting remission. Hence, IBD treatment represents a large unmet clinical need.

Scientific interest: It is only recently that we begin to appreciate the role of innervation of lymphoid organs, such as [redacted] and lymphoid follicles in the gut. This project wants to explore the possibilities of the neuronal routes to intervene with inflammatory processes, with a focus on IBD. We have already shown that denervation affects the course of intestinal inflammation. The clinical potential of employing neuronal signaling to restore immune balance in the gut is evidenced by the success of ongoing clinical trials of vagal nerve stimulation (VNS) in rheumatoid arthritis (Koopman FA et al, PNAS 2016), and IBD (Bonaz et al, J Physiol 2016). However, the VNS is not only invasive, but also crude (it stimulates the large cervical portion of the vagus that contains both efferent and afferent cholinergic and adrenergic nerves projecting the entire body), and is not based on an appropriate mechanistic concept of action to allow improvement. For instance we showed that the immune cells in colonic mucosa (in IBD) are not directly innervated by the vagus nerve (Cailotto et al, Neurogastro and Mot 2011), so any clinical effect sorted by VNS is by definition indirect. This lack of understanding of the neuronal effector pathways and targeted immune cells hampers further improvement of efficacy of the treatment.

This project will address this issue by stimulating the nerves at a site more distal to the (immune)organ such as [redacted], rather than the crude cervical vagal nerve stimulation tested thus far. This with the aim to reduce immune cell activation relevant in IBD. Denervation and stimulation experiments will establish proof of concept for nerve intervention to affect disease course in IBD models. Transcriptional and cellular analyses of immune cells in the targeted tissue will allow titration of the signal. Preclinical analyses are geared towards human spleen innervation. The aim of those studies is to test a prototype for [redacted] a pilot IBD patient population. In this project, GSK Bioelectronics and AMC collaborate closely, which will leverage the development of an effective device for use in human IMIDs greatly.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

General strategy of experiments;

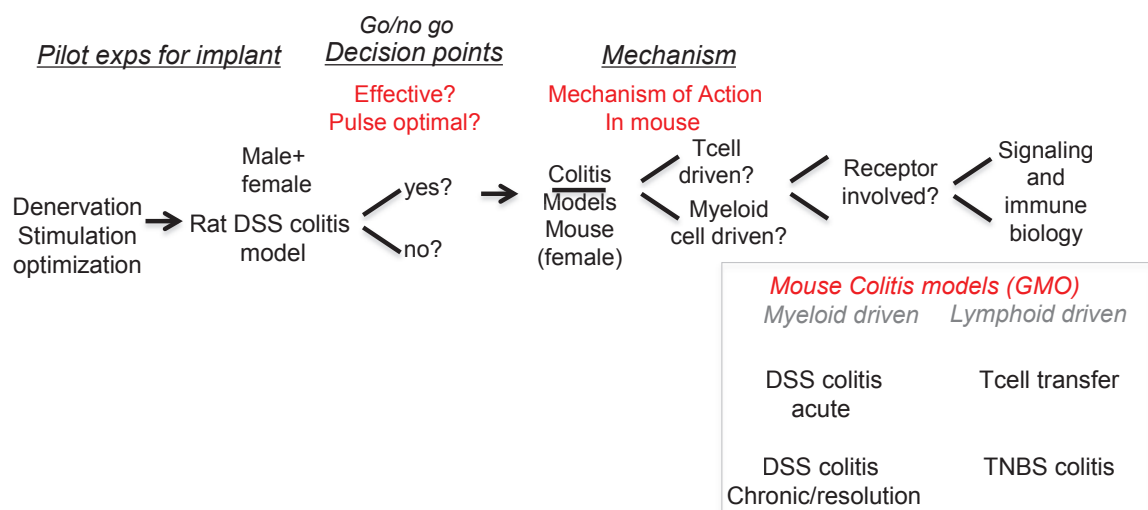


Fig. 3. Strategy of research, including indications of go/noGo points. First, pilot experiments in rat will allow us to pinpoint intervention points in three different nerve bundles (vagal nerve, mesenteric nerve, [redacted]). Experiments will be performed to optimize implantation, denervation, and optimal stimulation parameters in acute stimulation experiments in rat. Next we will test efficacy of stimulation in IBD models in rats. In mouse IBD models, female mice are described to be the gender of choice. If stimulation is effective on reducing IBD, the next will be to move to (GMO) mouse models of myeloid- or lymphoid-driven IBD to determine the mechanism of action.

Key objectives and decision points:

- 1- to establish an optimal stimulation protocol for a nerve-bundle or plexus to reduce immune cell activation (by means of stimulation of vagal, mesenteric, or [REDACTED])
- 2- to apply this stimulation in models of IBD in rat to evaluate the inflammatory response that causes disease and to decide on the stimulus given in mouse models in objective 3
- 3- to decipher the mechanism by which stimulation acts on the disease course in mouse models of IBD

Ad 1- optimization of the parameters and surgery of the stimulus given. The stimulation paradigm will be varied (1-frequency, 2-current strength, 3-pulse duration, and other potential parameters that can be determinants in the effective immune-modulation). Optimal stimulation will be determined according to blood flow changes in targeted tissue, as well as measurement of neurotransmitter release, and local cytokine release measurements.

Specific procedures to optimize the parameters of electrical stimulation.

In earlier studies in human, effects of vagal nerve stimulations on the immune response were measured by determining cytokine secretion in blood cells ex vivo stimulated with LPS (Koopman FA et al, PNAS 2016)). Similarly, we will optimize the effects of nerve stimulation on 1) cytokine release in ex vivo stimulated cells from different organs, and 2) acutely after stimulation in vivo. To do the latter, the animal will be injected intraperitoneally with an immune challenge (LPS or other immune stimulator) after a nerve bundle was stimulated (under anesthesia), and immune cells will be collected from peripheral blood or lavage fluid and immune response measured. We aim here to determine the optimal electrical stimulation parameters that affect immune responses relevant to IBD.

Control animals for baseline measurements and sham-stimulated animals are required to ensure that preparing and "cuffing" the nerve alone does not give the same/more/less neurotransmitter release.

Go/no Go: not applicable, the optimal stimulation will be used.

Ad 2- Chronic stimulations of (para)sympathetic nerves using implanted devices. In previous research we have constructed effective cuff electrodes for use in **rat**. For instance, we have adapted these electrodes to fit the superior mesenteric nerve bundles. A similar strategy will be applied for other nerve bundles, such as [REDACTED] and vagal nerves. Gender of Rat/mice; earlier data in mouse colitis models demonstrate a more reproducible outcome in female mice (for reasons outlined in Bijlage), favoring the use of female mice in colitis experiments (fig 4). Generation of disease symptoms will cause fighting behavior and additional stress factors in male mice, compared to female, which will directly affect the outcome of these experiments. We will use both male/female in rat IBD experiments.

Nerve stimulation in inflammation models: After implantation and recovery stimulation will be performed daily in IBD models for specific time intervals. Specific stimulation parameters (amperage, frequency, time) will be determined for each experiment and provided in the WP-IVD protocol. Details are in the bijlage.

Nerve denervation experiments. We aim to apply selective nerve denervation surgery and assess the effect of specific immune processes mediating IBD. Details are in the bijlage.

Go/no GO decision points: effective reduction of disease in rat IBD. Lack of effect of either nerve stimulation in rat models will be a no-go point to carry out experiments in mice. The ineffective reduction of IBD symptoms in rat models after stimulating a specific nerve will be a no-go for experiments in 3.

Ad 3. Mouse models of colitis. These will be carried out based on the findings on gender (favoring female as in point 2), stimulation, and nerve(s) determined in 2.

Go/no Go decision points: not applicable in this stage, we will use the stimulation, type of nerve, and gender as deduced from 2

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

The strategy of experiment (see also Fig 3). As outlined above, our strategy is to first establish the surgical method and parameters for stimulation in rats because of their size. These experiments will determine gender, type of nerve, and stimulation parameters to be used.

As mouse models for IBD provide better tools to gain insight into the mechanism of action (reviewed in te Velde et al, IBD 2017), we plan to analyze the working mechanisms in mice.

If the (chronic) implantations in rats are successful, implanted cuff electrode and denervation techniques will be adapted to mice to deduce the mechanism of action of efficacious stimulation/denervation protocols.

In general, we have chosen for a staged format of experimentation, **first** optimizing the implantation studies, nerve bundles, and stimulation protocols, **next** determining efficacy in proof of concept experiments in rat, and **third**, to transfer such implanted devices to mice to determine their mechanism of action.

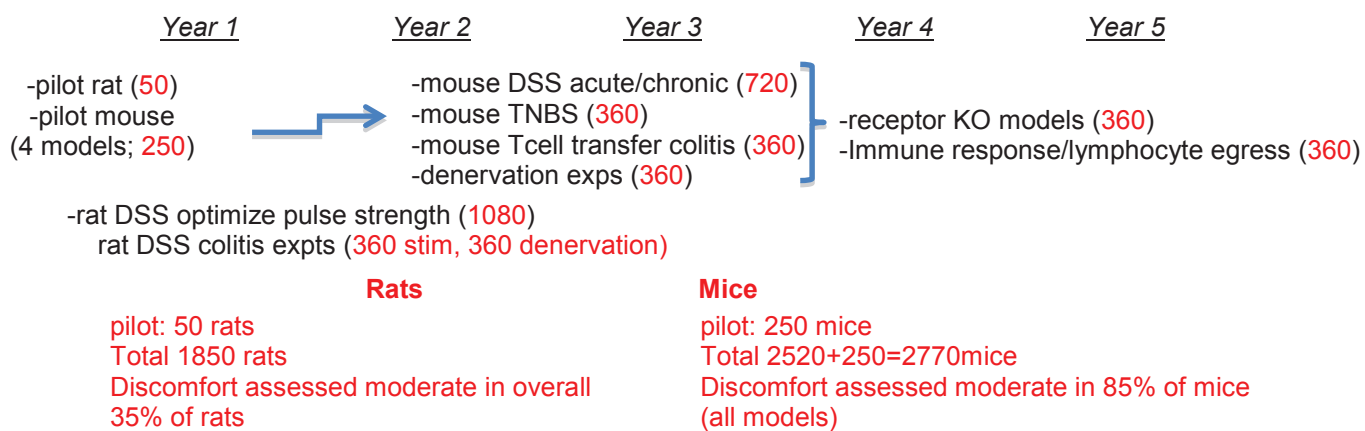


Fig 4. Strategy of experimentation and estimated number of rats and mice used, including assessment of the percentage of those animals suffering discomfort (in red). Numbers mentioned include a pilot phase of experimentation (in red indicated) where we need to establish the IBD models in our new animal facility. For calculation of number of mice/rats and experimental groups please refer to the bijlage.

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.

Research strategy: See also figure 3.

1-Optimization. Nerve stimulation and denervation protocols will be tested in rats, since we have most experience with this model. Using rats instead of mice will avoid a learning curve, which would affect the optimization of the protocol.

2-Proof of efficacy. For the same reasons as stated under 1), we will establish the efficacy of nerve stimulation and denervation protocols in rat models of IBD.

3-Mechanism of action. The availability of rat models of IBD are restricted to DSS. Once we have optimized the protocols, we will therefore turn to mouse models of colitis that are better to tease out mechanism of action.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	intervening with neuronal signaling in rat and mouse experimental IBD
2	
3	
4	
5	
6	
7	

8	
9	
10	



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	Zenuwprikkeling als therapie tegen chronisch darmontstekingsziekten
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Zenuwstelsel, immuunsysteem, ontstekingsziekten, nervus vagus, sympathicus

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 is al decennia lang bekend dat er een nauw verband bestaat tussen het zenuwstelsel en het afweersysteem. In recente studies is vooruitgang geboekt in het gebruiken van deze samenhang voor de behandeling van chronische ontstekingsziekten. Het basisidee is dat het prikkelen van een zenuwbundel het ontstekingsproces in chronische ontstekingsziekten kan remmen. Gebleken is dat het zenuwstelsel een sterkere invloed heeft op ontstekingsprocessen dan eerder werd aangenomen.</p> <p>De wetenschappelijke vraagstelling is of het elektrisch prikkelen van zenuwen een aantrekkelijke behandeling is bij chronische aandoeningen zoals reumatoïde artritis of colitis (aanduiding voor de ziekte van Crohn en colitis Ulcerosa). Uit recente studies bij patiënten is gebleken dat prikkeling van de grootste zenuw van ons lichaam, de nervus vagus, ontstekingen kan</p>
---	---

remmen. Dat leidt tot een vermindering van klachten. De effecten waren meetbaar maar niet zo heel sterk. Toch zijn patiënten blij met deze behandeling omdat er dan geen medicijnen meer nodig zijn.

De prikkeling die wordt gebruikt, is niet specifiek gericht op het ontstoken gebied en het is onbekend hoe zenuwen ontsteking remmen. We verwachten dat zenuwprikkeling beter kan werken als de zenuwen van het ontstoken orgaan zelf worden aangepakt. De behandeling moet dan zo worden aangepast dat de ontstekingscellen geremd worden. Dit willen we in dierenexperimenten aantonen.

In oudere studies werd voornamelijk de grote hersenzenuw, de nervus vagus, geprikkeld. Nu weten we uit recent onderzoek, dat het prikkelen van andersoortige zenuwen, de sympathische zenuwen, veel effectiever zal zijn. Deze zenuwen sturen veel organen aan die betrokken zijn bij de afweer van het lichaam.

In dit project, dat alleen over darmontsteking (colitis) gaat, willen we bewijzen dat er samenwerking is tussen zenuwen die de darm en ook de afweerorganen prikkelen. Als we dan die zenuwen gaan prikkelen willen we kijken of dit de ziekteverschijnselen bij darmontsteking in proefdieren vermindert. Daarbij willen we de sterkte van het elektrische signaal op de zenuwbundel zo goed mogelijk bepalen om een zo groot mogelijk effect op de afweer te hebben.

Nadat de werkzaamheid van onze implanteerbare elektroden in ratten en muizen zal zijn aangetoond, zullen we dezelfde manier van zenuwprikkeling ook in de mens toepassen. Het gebruik bij patiënten van dit innovatieve principe is binnen handbereik, want implanteerbare apparaten voor de behandeling van chronische ziekten zijn reeds goedgekeurd in Amerika.

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

We verwachten in dit project te kunnen vaststellen welke elektrische signalen we moeten geven om ontstekingen te remmen, en welke zenuwbanen we daarvoor moeten prikkelen. We verwachten dat dit onderzoek ons meer inzicht zal geven in de werkingsmechanismen van zenuwprikkeling. Hierdoor zullen we in staat zijn zulke elektroden te gebruiken voor patiënten met een chronische ontstekingsziekte van de darmen.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Ratten:1850, en 2770 muizen voor onderzoek naar darmontsteking.

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

Darmontsteking. Een deel van de ratten (35%) en het merendeel (85%) van de muizen zullen te lijden hebben van een ontsteking van de dikke darm. Hierbij ontstaan diarree, bloedverlies bij de ontlasting, en gewichtsverlies (of minder gewichtstoename).

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

In het onderzoek naar darmontsteking, wordt het ongerief wordt voor een deel (ongeveer 65 %) van de dieren ingeschat als "matig", aangezien het een langdurige ontsteking betreft. De andere 35% van de dieren zal licht of geen ongerief ondervinden, aangezien deze zijn ingedeeld in controle groepen.

Het kan zijn dat de zenuwprikkeling zeer effectief is en het matig ongerief minder maakt, anderzijds worden ook experimenten uitgevoerd waarbij zenuwen worden doorgesneden, en waarbij de ziekte ernstiger kan worden.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren worden gedood, waarna de weefsels worden uitgenomen voor onderzoek.



4 Drie V's

4.1 **Vervanging**

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

Het project richt zich op de ingewikkelde samenhang tussen het zenuwstelsel en het afweersysteem van het lichaam. Helaas kan zo'n ingewikkelde vraagstelling alleen in een levend dier worden beantwoord. De vervolgvragen over het mechanisme van waarom zenuwstimulatie ontsteking vermindert, zullen we, waar mogelijk, ook in geïsoleerde cellen van mens en dier uitvoeren.

Dus voordat we zenuwstimulatie in mensen kunnen toepassen, is onderzoek in dieren noodzakelijk.

4.2 **Vermindering**

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

We beperken het aantal dieren in het experiment op basis van eerdere studies, die aangeven in hoeveel dieren een verbetering meetbaar moet zijn om te kunnen spreken van een duidelijk effect.

Verder kiezen we voor een gefaseerde aanpak van de experimenten: we bepalen eerst de meest geschikte prikkelsterkte in gezonde ratten; pas daarna testen we die in modellen voor darmontsteking. Zo verminderen we het gebruik van dieren in modellen met veel ongerief.

Daarnaast bepalen we de juiste prikkelsterkte in de modellen voor darmontsteking bij ratten, zodat we die later kunnen toepassen in modellen voor darmontsteking bij muizen, ervan uitgaande dat bij rat en muis dezelfde zenuwstimulatie zal kunnen worden gegeven.

4.3 **Verfijning**

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

In dit project kiezen we voor modellen van darmontsteking, omdat eerder wetenschappelijk onderzoek, en klinische testen, hebben aangetoond dat in deze ziekten zenuwstimulatie werkzaam kan zijn. De modellen voor darmontsteking zijn gekozen omdat deze modellen (rat en muis) een goed beeld geven van de manier waarop zenuwstimulatie de ontsteking remt. In de strategische opzet van de experimenten kiezen we ervoor om de electrode plaatsing en de stimulatiersterkte eerst in ratten te optimaliseren, omdat de rat een groter dier is dan de muis. De verfijnde chirurgische techniek die nodig is om de zeer kleine zenuwbundels te prikkelen kan beter niet in het kleinste dier worden ontwikkeld.

Maar het model voor darmontstekingen in muizen lijkt in sommige aspecten meer op dat van darmontstekingen in de mens. In modellen in muizen kunnen de betrokken celtypen bijvoorbeeld beter uitgezocht worden. Ook bestaan er genetisch gemodificeerde muizenstammen waarbij specifieke processen beter kunnen worden bestudeerd. Daarom is ervoor gekozen om na optimalisatie van de zenuwprikkeling in ratten, deze daarna in muismodellen te testen, waarin specifieke aspecten van darmontsteking in de mens beter kunnen worden nagebootst.

Dus om tot verfijning te komen kiezen we voor een opzet van de proeven waarbij we eerst in een rat de elektroden implanteren, en controleren welke elektrische prikkel het beste werkt. Vervolgens gaan we in darmontsteking modellen bij muizen het werkingsmechanisme verder bestuderen. Aangezien de rat groter is, vergemakkelijkt dat de implantatie en de bepaling van de juiste prikkelsterkte. Zo kunnen we sneller tot een goede

prikkel komen die ontsteking-remmend is hetgeen ook minder dieren kost.

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

Uiteraard zal pijnstilling worden toegepast waar mogelijk. We zorgen ervoor dat de ratten en muizen sociaal kunnen worden gehuisvest, door de stekker op de kop van het dier waarmee de elektroden worden aangesloten aan de apparatuur goed af te schermen, en de dieren er dus niet aan kunnen komen.

Door de dieren te huisvesten in zogenaamde IVC kooien, wordt besmetting met ongewenste bacteriën en virussen voorkomen. Daardoor zijn de experimenten beter gecontroleerd en beter te herhalen. Als gevolg daarvan zijn er minder experimenten, en dus minder dieren, nodig om de werkzaamheid van de zenuwprikkeling aan te tonen.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



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.	11800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academic Medical Center	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>		Intervening in neuronal signaling to lymphoid organs in models for inflammatory bowel disease (colitis)

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

The rationale for this project is that immune cells express receptors for neurotransmitters and are functionally affected by neurotransmitters in vitro and in vivo. To achieve immunomodulation, we will intervene with neuronal activity by using cuff electrodes that can be implanted. We will test its effect on models of IBD by electrical stimulation of the vagus nerve or the sympathetic periarterial plexus that innervate the [REDACTED] or intestine.

Rationale for the experimental setup.

In this project we will address denervation and stimulation of nerve bundles. Choices for neuronal interventions will be based on the optimisation of electrode cuff devices that can be implanted around particular nerve bundles to stimulate the nerve output. The optimal stimulation to achieve a desired effect on immune cells will be determined. The effect of such stimulation will then be assessed in models of IBD.

The experimental setup of experiments is as follows:

- 1.establish an optimal stimulation protocol for the vagal, mesenteric, or [REDACTED] to reduce immune cell activation via acute stimulation experiments in anaesthetized rats.
- 2.apply this stimulation protocol in rat models of IBD to assess the reduction in the inflammatory response that causes disease to identify the nerve
- 3.establish the mechanism by which nerve stimulation affects the disease course in mouse models of IBD

The models for IBD. To study the mechanism of action of neuronal innervation affecting colitis we propose the following models.

A. two chemically induced colitis models:

1-acute and chronic Dextran Sodium Sulfate (DSS) induced colitis, used in mice and rats.

2-2,4,6-trinitro benzene sulfonic acid (TNBS) induced colitis (mice).

In the DSS model, rats or mice are subjected several days to drinking water supplemented with DSS, which is directly toxic to colonic epithelial cells of the basal crypts. DSS also interacts with the mucus charge allowing luminal bacteria to directly interact with epithelia, causing an innate mediated colitis. In the TNBS model, colitis is induced by intrarectal administration of the covalently reactive reagents TNBS, induces a T-cell-mediated response against hapten-modified autologous proteins/luminal antigens.

B. a T-cell driven colitis model (mice):

3-the CD45^{rb}^{high} T cell transfer model of colitis is the most widely used model to study the initiation, induction, and regulation of immunopathology in chronic colitis that is mediated by T cells. A number of mouse models are available to assess the contribution of T cells in the pathogenesis of IBD.

Primary outcome parameters:

The mouse and rat models of colitis display variable degrees of similarity with human IBD: they lead to weight loss and wasting disease, colon inflammation, and lesions in the epithelium. Some models are more driven by innate immune cell activation in the bowel (DSS-induced colitis) and others are more dependent on delayed type hypersensitivity reactions (TNBS model) or T cells (Tcell transfer colitis models).

Clinical outcome parameters. Weight, diarrhea, colon length/weight, spleen weight, and endoscopy score are established outcome parameters of colitis.

Molecular outcome parameters for inflammation. Colitis is assessed by measuring cytokine/inflammatory mediator expression and protein release, and by scoring histological indicators for colitis in the colon. Furthermore, we have shown that the blood supply of the intestine allows a constant flow of immune cells to enter the tissue, which consists of different compartments i.e. intestinal muscularis, lamina propria and mucosa. The migration of these immune cells into the intestine is under the control of adhesion molecules (VCAM, ICAM) allowing the cells to be retained in the intestine, and of various chemokines (CXCL13, CCL19, CCL21) produced by stromal cells present in each compartment. The expression of such chemokines depends on the immune challenge, and leads to the retention of immune cells from the blood vessels in the intestine. Hence it is important to monitor expression of these molecules in our models of IBD, as immune cells and stromal cells receive neuronal information that can alter their activation status.

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.

Optimizing the nerve stimulation rat:

Acute stimulations (stimulation of the nerve bundle under anesthesia and analyses in tissue (<4h):

1-Cuff electrode design and testing of stimulation paradigm in rat. A consortium consisting of neuroscientists, engineers (Cambridge University), CorTec corporation, and researchers in the AMC have developed specific cuff electrode probes to stimulate sympathetic and parasympathetic nerves. The intervention is as follows: Rats are placed on a proper heat mat and electrodes are positioned on the vagal nerve via an incision in the neck. The diameter of the cuff electrodes is 50-600micrometer, dependent on which nerve is to be targeted. The nerve is located and stimulated with a hook, cuff, or implanted device. The stimulator equipment can deliver for instance 200microAmp current with a frequency of 10Hz and a pulse duration of 2 ms, and delivers these signals for 15 min, 2hr, 4hr or 6hr. The rats are then sacrificed and tissue is collected for various measurements. Control animals for baseline measurements and sham stimulated animals are required to assess the effects of preparing and manipulating the nerve alone.

The effect of stimulation of the nerve bundle in the acute setting will be evaluated as follows:

-Multiple stimulation settings (frequency, amplitude, and duration of the pulse) will be applied and optimized by measurement of blood flow changes in the targeted organ, and by changes in the production of inflammatory mediators in the targeted organ and in whole blood assays performed *ex vivo* after LPS stimulation (as established earlier (Levine et al, PLOS ONE 2014; Koopman et al, PNAS 2016)). An optimized stimulation is aimed, meaning a stimulation that affects immune response parameters without affecting blood flow/perfusion through the tissue.

-we will test the response of nerve stimulation to an injected immune challenge *in vivo*, i.e. LPS by intravenous or intraperitoneal injection. Blood cytokines and other indicators of immune activation will be measured shortly thereafter.

These above described acute experiments, where nerve stimulation setting will be tested in anaesthetized rats to assess appropriate settings for stimulation, can be regarded as pilot experiments for the current chronic stimulations where implanted devices are to be used.

Implantation of electrodes for chronic stimulation in rat.

The right placement of electrodes in rats was tested previously in anesthetized rats (terminal experiments) in earlier approved DEC protocols. We are now able to locate the nerve and successfully stimulate it, and established the best way to tunnel the wires to the back of the head and attach them to the skull. After implantation and recovery, the nerve will be stimulated daily (during DSS experiments). Specific stimulation parameters (amperage, frequency, time) will be determined for each experiment and provided in the WP-IVD protocol.

Implantation of electrodes. The right placement of electrodes in rats has been tested previously in anesthetized rats (terminal experiments). We are able to locate the nerve and successfully stimulate the attached nerve and established the best way to tunnel the wires to the back of the head and attach to the skull. We have trained ourselves for the operation in an earlier approved IVD protocol.

Experimental approach nerve denervation rat/mouse.

Alternatively, we will denervate nerves in IBD models to demonstrate the reverse effect to stimulation. Denervation will be performed on similar nerve bundles as those stimulated, but not per se similar location on the bundle, because we may be able to denervate more distal to the target organ whilst stimulation may not be possible at that location, due to anatomical difficulties to place the cuff.

Nerve denervation of the **vagus** nerve can be achieved by cutting the right celiac branch of the vagus nerve, as previously described (Costes et al. 2014). Denervation of the **spleen** and/or **colon** and **ileum** is performed by "cleaning" the mesenteric artery or [REDACTED] from the attaching nerve tissue. The effectiveness of this latter procedure as determined by Mass Spec analyses of spleen tissue is around 80% in rats and mice (earlier DEC protocols).

Selective denervation of the nerves to the [REDACTED] is performed by cutting the nerve bundle/plexus to be targeted, as previously described (Cailotto et al., 2012). Selective denervation of the nerve bundles/plexus surrounding an artery (the splenic or mesenteric artery) is performed by "cleaning" the adjacent tissue of these arteries from nerve tissue. Vagal nerve and sympathetic nerve denervations will be performed as described earlier (Oliver et al, Eur J Immunol 2016).

Rat colitis models:

DSS colitis: Once a stimulation protocol for a nerve has been optimized, we will evaluate the effects of nerve stimulation or denervation on the clinical course of colitis. The rat is the initial model of choice because of the size of the nerve bundles and because we have gained pilot experience in setting up the DSS colitis model in the rat. In pilot experiments, we have established the optimal concentration of DSS and time span over which the colitis develops in rats (7 to 9 days).

If the outcome of the experiments in rats is promising, we will apply these protocols to mouse colitis models.

Mouse colitis models:

DSS colitis: From our experience with DSS colitis in mice, we expect that the animals will show a loss in body weight after 3-4 days of exposure. The concentration of DSS and exposure time affect the inflammation in the colon. As inflammatory readout, the disease activity score (endoscopic assessment, clinical features of colitis), histological examination and pro-inflammatory cytokines expression in colonic tissues will be used. The DSS colitis will be performed in **acute** setting (7 days DSS) or in a recovery

context (5 days of lower dose of DSS, with a recovery period of up to 35 days (“**chronic model**” as in Olivier et al, European J Immunology, 2016).

Tcell transfer colitis: Transfer of FACS-sorted CD4⁺CD45RB^{high} T lymphocytes of a healthy donor mouse to an immune-incompetent SCID (of RAG-1 of -2 knock-out mouse, is a well validated model for T-cell dependent inflammatory colitis. Transfer of sorted CD4⁺ Tcell generates colitis due to the lack of regulatory Tcells in the transferred population. The mice develop colitis over a longer time course (6-9 weeks) which mimics well the human chronic course of IBD. Gene expression analyses of Tcell transfer colitis tissue and human IBD tissue was reported to show similar gene pathways indicating similarity of the immune process. This model, therefore, allows us to evaluate the function of neuronal innervation of lymphoid organs in Tcell activation, because 1) the role of Tcell activation can be studied appropriately in 2) a chronic colitis model with good resemblance to human IBD. Because 3) donor Tcell to be transferred can be derived from GGO mice, e.g. adrenergic receptor-deficient mice, the role of these (adrenergic) receptors in the disease process can be determined.

TNBS colitis: TNBS colitis is induced via intrarectal administration of TNBS, in 40% ethanol, which induces a type IV hypersensitivity reaction. The ethanol is used to trigger a transient intestinal barrier disruption to allow the TNBS to act as a hapten. The reaction triggered is a typical Th1 Tcell response seen in many IBD patients, especially as seen in patients suffering from CD.

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

Power calculations of all models in which the **pulse will be optimized** (80% power with a significance level of 0.05) will be based on the improvement of the primary outcome parameter of reduction of cytokine release in tissue and blood after stimulation of 40% and SD values around 30%. A quantification of secreted cytokines will be carried out in the supernatants of cultured splenocytes, tissues cells, or blood cells as primary read out for efficient stimulation. References describing this effect on which these numbers are based on are Picq et al, PLOS ONE 2013, Meregnani et al, Autonom. Neurosc. 2011, and Levine et al, PLOS ONE 2014 (the latter in a model for rheumatoid arthritis in which similar reduction of disease is seen after vagal nerve stimulation).

Power calculations of all models in which **an implanted stimulation device is used** or where denervation is performed (80% power with a significance level of 0.05) will be based on the improvement/worsening of the primary outcome parameter of histological scoring of colitis of 40%. To illustrate this, our experience with previous colitis experiments has indicated that an improvement of histological score or 40% can be regarded as significant improvement. This is for instance exemplified in published studies from our group (Snoek et al, Br J Pharmacol 2010), where neurotransmitter agonist molecules are tested in DSS and TNBS-induced colitis models. Disease Activity Index (DAI; Ten Hove et al 2010)) in these experiments is dictated by histological improvement at a score interval 0-3, was observed in experiments of n=10, with app. 30% SD values. We recently reproduced similar DAI improvements in pilot experiments in rat DSS colitis (unpublished-Willemze et al) using 10 rats per group. Similarly, we have produced a worsening of outcome by 40% in this group size of 10 upon **denervation**. Relevant references in which denervation is described are Levine YA et al, PLOS ONE 2014, where vagal nerve stimulation was tested in models of rheumatoid arthritis, and Olivier et al, Eur J Immunol, where effect of denervation was tested in chronic models of colitis, although cytokine production was not the primary outcome parameter in this study.

To determine the expected number of experimental groups to be used in each colitis model (rats or mice) will be dependent on the model used. In general, we envision experimental groups as follows (6 groups per experiment). First, a cuff implant or denervation surgery is performed, after which a minimum of 10 day recovery period is allowed. Next the following groups are assigned; 1. Mice or rats, untreated, no colitis; 2. Mice or rats, treatment; no colitis; 3. Mice or rats, no treatment, colitis (either DSS or TNBS induced, or Tcell transfer colitis); 4. Mice or rats, treatment; colitis (either specific nerve bundle stimulation or denervation); 5. intervention group 1, colitis; no treatment and 6. Intervention group 2, colitis; treatment (either specific nerve bundle stimulation or denervation). In these experiments, the power will be determined expecting a significant improvement/worsening of histological score or cytokine/mediator release.

B. De dieren

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

-numbers foreseen in pilot experiments. We will determine the optimal conditions for colitis models, given the new facility that was just reconstructed. This new facility has a new microbial status and housing conditions that influence the colitis, so we need to test our models. These pilots will be done in all colitis models mentioned (rats DSS, mouse DSS, TNBS, CD45rb transfer colitis). We expect to need 5 experimental groups in which different conditions need to be tested in groups of 10 rats/mice. In total: rat DSS: 50, mouse DSS acute: 50, DSS chronic: 50, TNBS: 50, CD45Rb transfer, 50 RAG1-/- and 50 Tcell donor mice. In total we need 50 rats and 250 mice.

Animal species, origin, age and gender.

- Next, in our optimized rat experiments with DSS colitis we will decide which sex is most responsive, in case no gender difference is seen in rat, we can use both genders.
- The rat is the initial model of choice because of its 10-fold larger size compared to mouse.
- The mouse is the animal of choice because good colitis models exist and genetically modified mice are available. In mice colitis models we will only use female mice for colitis models as male mice have been shown to display stress and fighting behaviour which affects the outcome of colitis as described earlier (see article: <https://www.ueg.eu/education/latest-news/article/article/mistakes-in-mouse-models-of-ibd-and-how-to-avoid-them/>). In the T-cell transfer model both male and female mice are used but in general, DeVoss and Diehl (DeVoss J and Diehl; Toxicol Pathol 2014; 42: 99–110) recommend using female animals if possible. They indicate that male animals are more prone to display aggressive behavior resulting in fighting, with the resulting stress and wounds potentially having a negative impact on a study. As said, this is also our own experience.
- Wild type and genetically modified mice (for instance adrenergic receptor-deficient mice (stock number 003810) are available from Jackson Laboratories.
- Mice will be used between 7 and 16 weeks of age (we aim to use young adults mice of 7-16 weeks but to obtain sufficient group sizes of e.g. SCID mice, we may have to deviate from the 7-16 weeks age group and use older mice).
- Genetically modified mice will be bred in the Animal facility of the AMC, whereas wild-type mice will be purchased from licenced companies like Charles River or Envigo, or when possible bred at AMC facilities. The proposed mouse strains/lines are already available.

Numbers of rats/mice: For rat and mouse DSS colitis experiments we expect to perform max 6 experiments per year with group sizes that need to be determined exactly, but based on historical data a group size of 10 rats and 6 experimental groups, amounting to 60 rats per experiment. Similarly, we expect to need 10 mice per group in further experiments, and a standard experiment has 6 experimental groups thus a total experiment is done with 60 mice per experiment. The project runs for 5 years but we will be expected to need to do 6 experiments per year, as outlined in fig 4 in the protocol.

RAT experiments:

1. Pilot IBD: optimisation IBD model due to reconstruction mouse facility: we need 50 rats
2. Pulse optimisation: we need the following number of rats: we will optimize frequency (1), pulse duration (2) and current strength (3), and combinations thereof (4-6). Hence we anticipate to need 6*60 rats testing per nerve (splenic, SMN, vagal) so 3*360=1080 rats for optimisation. **So total rats used for optimisation of the pulse will be max 1080.**

3. Number of rats needed for implant and experimental testing of the optimized pulse in rat IBD model.

We anticipate the testing of stimulation of the pulse in 2 groups of 60 rats =120 rats in 3 nerves is **360** rats.

Number of rats needed for denervation, once we have optimized the pulse on 3 nerves: **360.**

So total number of rats we anticipate to need: 50+1080+360+360=1850 in total

MICE experiments:

1. pilot IBD models due to reconstruction of animal facility: we need 250 mice.

2. Numbers of Mice needed in stimulation/denervation exps. As outlined in Fig 4 in the project, for 4 different models of IBD we need 4x360=1440 mice. This figure is built up as follows: per model, 3 nerves to test with an optimized pulse in groups of 60 mice: 180, 3 nerves that are denervated in groups of 60: 180; so 360 mice per model, 4 models: **4*360=1440** mice. For receptor KO models we need additional groups of 60 mice in 4 models, to be tested in 3 nerves (**720**) mice, for immune response/immune cell egress experiments we anticipate to require 360 mice as we will not test this in all models.

So total mice used for experiments is 7x360mice=**2520.**

So total number of mice we anticipate to need 2520+250=2770 mice in total.

Given our staged experimental design, we may choose to use one colitis model in mice that proves to be responsive in our stimulation experiments, and we may not test the intervention in all mouse colitis models. The latter will reduce the number of mice needed for the colitis experiments.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

X 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” The aim of the current project is to study the extent to which neuronal innervation can be modulated to ameliorate the inflammation. To mimic the complex interplay between cell types (neuronal cells, but also cells in the spleen, lymphoid follicles, and intestinal mucosa), we need to perform the colitis experiments in which this interplay is studied in rodents. Unfortunately, such interactions require an intact organ system, and cannot be studied in vitro.

“Verfijning” Logically, to minimize animal discomfort as much as possible, we will employ anaesthesia (as indicated above in the description of the procedure), whereas we will monitor the rats/mice for any sign of discomfort and mice with too much discomfort (thus reaching the humane endpoint; see at point J below) will be sacrificed. To further refine the experiments, rats/mice are housed in groups (if possible) in enriched cages with appropriate bedding and free access to food and water. The fitting of electrode connectors with an aluminium cap placed on the head allows social housing of rats as we have already established. Moreover, we will enhance the chance of successful animal experiments by first optimizing electrical probe (cuff) placement and stimulation in rat, before moving to mice, so that strictly mechanistic studies can be performed in mice in a pre-optimized setting. Another point of refinement is that optimisation of the enervation of the nerves will be performed under complete anaesthesia (rats will not recover after the experiment) before progressing to the IBD model experiments.

“Reducing” To reduce the number of mice and rats to be used, we will adjust the (minimal) necessary group size in subsequent experiments, based on earlier studies in our group in similar models and similar interventions in the neuronal system (Snoek et al, Br J Pharmacol, 2010).

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.

As indicated above, we will use anaesthesia and pain killing during pre-surgical placement of the cuff or denervation. To avoid effects on the environment we will strictly follow the D-I guidelines for animal experiments (which will be performed in a high health-status, restricted-entry barrier facility of the AMC). More importantly, our staged approach allows us to assess colitis in different colitis models and we have the opportunity to choose the model that is most consistent in its effect but also has the least morbidity to the animals.

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.

At least once a week, we perform extensive literature analyses (using PubMed with search terms "mucosal immunology", "sympathetic innervation", "parasympathetic innervation", " colitis" and "macrophages". Furthermore, we regularly visit scientific meetings to avoid performing experiments already performed before. The fact that the current project has recently been funded after international peer review suggests that the experiments are indeed novel (and scientifically important).

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.

During denervation/implantation we will use analgesics pre and up to one day postoperatively.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Event	Group	discomfort	Duration
Anesthesia	all	light	Minutes
Surgery placing stimulation electrode	all	none	120 min
Denervation surgery			45 min
Recovery from anaesthesia	all	moderate	Hours but pain medication for 2 days
Colonoscopy under isoflurane (various time points during colitis; to be specified in WP-IVD)	all	moderate	3 min
Stimulation nerve	All except controls	Light	5-10 min per day in cage
Colitis induction	all	mild Moderate	Up to day 6 Up to day 35
Sacrifice	all	Terminal	Very brief

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Colitis will give an inflammation in the intestinal mucosa, which likely will cause pain as seen in patients

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

We monitor the rats and mice and will sacrifice animals as soon as humane endpoint are reached.

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.

To be expected humane endpoints

Both after the surgery required to implant the cuff electrodes, and after the colitis-induction, the following humane endpoints will be taken into account: Weight loss higher than 20% of starting weight, retaining diarrhea after 2 days following surgery, abnormal behavior (isolation, aberrant activity and/or mobility, clear piloerection).

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

Hard to say, based on experience 5%

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.

- Implantation of cuff electrode and head mount → under anaesthesia → mild discomfort
- Recovery from anaesthesia → moderate discomfort
- injection Tcells → mild discomfort

- Colitis model → moderate discomfort
- Stimulation of cuff electrode, including handling → mild discomfort

Rats:

1. IBD model optimisation, n=50, discomfort moderate
2. optimisation enervation, n=1080, discomfort mild
3. IBD model with nerve stimulation/denervation, n=720 of which the control group will undergo mild discomfort (n=120) and the experimental groups will undergo (maximally) moderate discomfort (n=600). Overall, 35% of rats will undergo moderate discomfort.

Mice:

1. IBD model optimisation, n=250, discomfort moderate
2. IBD model with nerve stimulation/denervation, n=2520 of which the control group will undergo mild discomfort (n=420) and the experimental groups will undergo maximally moderate discomfort (n=2100), Overall 85% of mice will undergo mild discomfort.

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.

In addition to endoscopic and clinical parameters, it is essential to analyse different organs and tissues at the end of the experiment. For the experiments described here, several tissues will be analysed such as the primary and secondary lymph-nodes and intestines. Samples will be analysed using multiple assays (immunohistochemistry, FACS, ELISA, etc).

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.

A. Algemene gegevens over de procedure

Bij de punten 1 t/m 7 dienen altijd de gevraagde gegevens te worden ingevuld.

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project **Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in rats and mice**
3. Titel van de NTS **Intervening in neuronal signaling to lymphoid organs in models for Inflammatory Bowel Disease (colitis)**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning**
 - ~~wijziging van vergunning met nummer~~
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC **DEC-AMC**
 - telefoonnummer contactpersoon 
 - e-mailadres contactpersoon 
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken **23-02-2017**
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD
7. Afstemming IvD

De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.
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 **n.v.t.**
 - Datum
 - Gestelde vraag/vragen

- Datum antwoord
- Verstrekt(e) antwoord(en)
- De antwoorden hebben wel/niet 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)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.

>Ja

Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.

2. De aanvraag betreft > een nieuwe aanvraag.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? > Ja

4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.

> Nee

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 (het onderzoeken van het effect van de neuronale innervatie van lymfoide organen [stimuleren of remmen van zenuwbanen] op de behandeling van chronische darmontstekingsziekten) en kan getypeerd worden als een project met drie subdoelen die uitkomst- en tijdsafhankelijk van elkaar zijn. De drie subdoelen dragen bij aan het bereiken van de hoofddoelstelling. De drie subdoelen zijn van elkaar afhankelijk omdat de bereikte resultaten ten behoeve van één subdoel nodig zijn voor het bereiken van de andere subdoelen. In het eerste subdoel wordt het stimuleren/denerveren van de zenuwbanen (nervus vagus, mesenterische en ██████████) geoptimaliseerd in ratten zonder ziektemodel en onder anesthesie. In het tweede subdoel wordt het effect van stimulatie/denervatie van zenuwbanen op het verloop van de colitis (resp. verminderd of versterkt) onderzocht in het ratten colitis model. Voor het derde subdoel wordt onderzocht wat de onderliggende mechanismen zijn van het effect van stimuleren/denerveren van de zenuwbanen op de ziekte, in verschillende muismodellen voor colitis. Voor het onderzoeken van de mechanismen wordt overgestapt naar muizen colitis modellen omdat hierin meer mogelijkheden zijn om het mechanisme te onderzoeken. De experimentele aanpak van de verschillende subdoelen is duidelijk omschreven. Dit maakt het tot een navolgbaar geheel. Het project lijkt haalbaar, afgaande op het voorwerk en ervaring van deze onderzoekers, de omvang van het project en de aangegeven tijdsspanne.

Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan in de dierproeven die nodig zijn om de subdoelen te bereiken.
Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.
> Niet, voor zover kan worden opgemaakt uit de aanvraag.
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 aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek gedaan naar de rol van zenuwbanen in de immuunrespons, maar ook in relatie tot de behandeling van colitis. Dit maakt het onderzoek tegelijk fundamenteel en translationeel.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).
> Het directe doel van het project is het verkrijgen van nieuwe inzichten in de rol die stimulatie van zenuwbanen in de immuunrespons in chronische ontstekingsziekten in de darm kan spelen. Het uiteindelijke doel is het bijdragen aan het ontwikkelen van nieuwe therapie (in de toekomst) voor de behandeling van de ziekte van Crohn en colitis ulcerosa.
Het betreft hier zowel fundamenteel onderzoek als translationeel onderzoek. Het directe doel vormt een logisch en onmisbaar deel van de route naar het uiteindelijke doel, dat niet direct binnen de grenzen van dit project valt.
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 project dat gericht is op het verkrijgen van meer inzicht in de rol die innervatie van zenuwbanen in de immuunrespons in chronische ontstekingsziekten kan spelen, zijn de proefdieren, de onderzoekers en, op termijn, patiënten die lijden aan chronische ontstekingsziekten zoals colitis.
Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress en pijn ondervinden. Waarden die voor onderzoekers bevorderd worden: de onderzoekers zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en mogelijk patenten.
Waarden die voor colitis patiënten bevorderd worden: het ontwikkelen van een betere therapie voor deze ziekte.
6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt

worden door specifieke wetgeving.

> Er is geen sprake van substantiële milieueffecten, voorzover de DEC dit kan overzien.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw antwoord toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

> De IvD ziet erop toe dat alle personen die bij dit onderzoek betrokken zullen zijn, zowel de analisten en onderzoekers die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van deskundigheid en kennis.

De onderzoeksgroep heeft veel expertise op het gebied van stimulatie/denervatie van de parasympathische zenuwbanen (nervus vagus) en met het voorgestelde ziektemodel. Ze hebben reeds implanteerbare elektrodes ("cuffs") ontwikkeld voor de sympathische zenuwbanen (van de ██████████). Hierdoor heeft de groep de expertise in huis om alle voorgestelde proeven uit te kunnen voeren en is er voldoende kunde in huis om aan de-3V beginselen te kunnen voldoen.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw antwoord toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

> De opzet van het project en van alle experimenten die worden ingezet voor elk van de subdoelen is logisch en goed te begrijpen. Na de technische optimalisatie van het stimuleren/denerveren van de betreffende zenuwbanen op de immuunrespons in de rat (doel 1), wordt deze kennis toegepast in een ratten colitismodel (doel 2). In deze experimenten wordt onderzocht of er een effect op de ziekte is. De onderliggende mechanismen zullen onderzocht worden in 4 verschillende colitis modellen in de muis (doel 3). Dit wordt in muizenmodellen gedaan omdat deze modellen meer mogelijkheden bieden om het onderliggende mechanisme te onderzoeken. Er worden meerdere modellen gebruikt omdat ieder model een bepaald aspect van de ziekte representeert. Er is hier sprake van een project met heldere onderzoeksopzet, die aansluit bij de gestelde doelen en de DEC verwacht dat de doelstellingen bereikt kunnen worden.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wod voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- 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)

> Er is geen sprake van bijzondere dieren, omstandigheden of behandelingen.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan omdat het om wetenschappelijke redenen noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht toe waarom wel/niet.

> Er is voldaan aan bijlage III

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

> Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

> De "heelheid" van het dier wordt nergens in die mate aangetast dat sprake is van verminking of ontneming van soortspecifieke eigenschappen.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De humane eindpunten zijn helder gedefinieerd, en het percentage dieren (5%) dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring van de onderzoeksgroep realistisch ingeschat.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> Het bestuderen van de complexe samenhang tussen de verschillende celtypes (neuronale cellen, structurele cellen en immuuncellen) maakt het gebruik van proefdieren noodzakelijk.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De aantallen zijn per model verschillend (rat DSS, muizen acuut en chronisch DSS, TNBS, CD45rb transfer colitis) en zullen op basis van een powerberekening gedaan worden (80% power, significantie nivo 0.05, in een pilot studie werd een SD van 30%

en een verschil van 40% gevonden en waren er 10 dieren per groep nodig om een significant verschil te verkrijgen). De aantallen die nodig zijn per proef zullen worden geschat op basis van gegevens uit eerdere experimenten. Hierdoor kan met een zo min mogelijk aantal dieren een betrouwbaar resultaat worden verkregen.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd? Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De optimalisatie wordt gedaan in ratten die vanwege hun grotere formaat hiervoor geschikter zijn dan muizen. De optimalisatie wordt verricht zonder ziektemodel en worden volledig onder anesthesie uitgevoerd (de ratten komen niet meer bij na het experiment), dit verlicht het ongerief van een groot aantal proefdieren. Er wordt anesthesie toegepast tijdens en direct na de operaties in de IBD modellen. De ziektemodellen zijn uiteindelijk noodzakelijk omdat alleen op deze wijze het effect op het ziekteverloop bestudeerd kan worden. De helder en concreet geformuleerde humane eindpunten borgen de mate van verfijning.

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

> n.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).

> Zowel mannelijk als vrouwelijke dieren zullen worden gebruikt in het ratten colitis model. Er wordt bepaald of er een sekseverschil waarneembaar is. Indien er geen verschillen blijken te zijn, worden beide geslachten gebruikt. In de muizencolitis modellen worden alleen vrouwtjes gebruikt omdat uit de literatuur en eigen ervaring van de onderzoeker blijkt dat bij mannetjes het vechtedrag en de daarbij komende stress invloed heeft op de ontwikkeling van de colitis. De DEC onderschrijft daarom de keuze voor uitsluitend vrouwelijke dieren in de muizen colitis modellen.

De dieren worden aangekocht bij commerciële instellingen, dan wel uit eigen fok verkregen. Het aantal in voorraad gedode dieren wordt verminderd doordat vrouwen en mannen beide gebruikt worden waar mogelijk in dit project.

19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van de richtlijn. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht dit toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De dieren worden in het kader van de proef gedood volgens een methode van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Doden is noodzakelijk omdat in het kader van het experiment de weefsels uit het dier moeten worden gehaald voor analyse.

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

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

> Ja, deze is in overleg met de afdeling communicatie van de vergunninghouder bewerkt met het oog op de begrijpelijkheid.

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigt het verkrijgen van inzicht in welke elektrische signalen gegeven moeten worden aan welke zenuwbanen om ontstekingen te remmen in colitis, het geringe tot matige ongerief dat de ratten en muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?

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*).

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op inzicht in het effect van zenuwbaanprikkeling op het verloop van de immunerespons in colitis en daarmee ook gericht is op de ontwikkeling van een verbeterde therapie voor colitis, zijn op korte termijn de proefdieren (1850 ratten en 2770 muizen) en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit de groepen patiënten die lijden aan colitis.

De proefdieren worden door dit onderzoek geschaad omdat ze licht (65% van de ratten, 15% van de muizen), of maximaal matig (35% van de ratten, 85% van de muizen) ongerief zullen ondergaan. De andere groep direct belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat meewerken aan dit onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij nieuwe vindingen mogelijk kunnen patenteren.

Minder direct aanwezig zijn de waarden en belangen van patiënten. Dit onderzoek kan

echter een belangrijke bijdrage leveren aan het ontwikkelen van een nieuwe therapie, aangezien implanteerbare apparaten voor de behandeling van chronische ziekten reeds is goedgekeurd door de FDA. Echter, dit ligt in de toekomst; het zou een mogelijk gevolg kunnen zijn, en behoort niet tot het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Hoewel de 1850 ratten en de 2770 muizen licht tot matig ongerief ondergaan, acht de DEC dit gerechtvaardigd door de gunstige gevolgen van dit onderzoek. De DEC waardeert de vermeerdering van fundamentele kennis en de toepassing daarvan op korte termijn als het meest zwaarwegende gevolg dat tegenover het geringe tot matige ongerief van de dieren staat. Het maatschappelijk belang van deze projectaanvraag is dat er meer inzicht komt in het effect van zenuwbaan prikkeling op de immuunrespons tijdens colitis. De toepassing van dit inzicht in de behandeling van colitis, zal jaren duren maar kan relatief snel verlopen omdat de zenuwbaanelektrodes al voor andere ziekten goedgekeurd zijn. Dit maatschappelijk gevolg weegt ook mee, zij het in mindere mate.

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*).

Het effect van het beïnvloeden van de neuronale signalering naar lymfoïde organen in modellen voor colitis

De DEC is van mening dat het belang van *het verkrijgen van meer inzicht in het effect van zenuwbaanprikkeling op de immuunrespons in colitis* op korte termijn (wetenschappelijke belang) en op langere termijn, de bijdrage aan therapeutische verbeteringen voor colitis (het maatschappelijke belang), het geringe tot matige ongerief dat de 1850 ratten en 2770 muizen als proefdieren in dit onderzoek zullen ervaren, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. Om dit doel te bereiken worden ratten en muizen als proefdieren gebruikt. De onderzoekers beperken het ongerief van de dieren door verschillende maatregelen (de experimenten voor de optimalisatie van de zenuwbaanprikkeling wordt zonder ziektemodel en geheel onder anesthesie verricht, pijnbestrijding tijdens/na operatie, veel ervaring met de operaties).

De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven wetenschappelijke doelstellingen en dat de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de kaders van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstelling te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De aanvrager heeft volgens de DEC overtuigend aangegeven dat gebruik van ratten en muizen voor het behalen van het directe doel noodzakelijk is en dat er geen geschikte proefdiervrije alternatieven mogelijk zijn.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

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 in de DEC unaniem tot stand gekomen.

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

Er waren geen knelpunten of dilemma's.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31
1105 AZ 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
AVD118002017842

Bijlagen

2

Datum 17 maart 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 17 maart 2017. Het gaat om uw project "Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in ". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD118002017842. 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 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD118002017842

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
17 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017842

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11800
Naam instelling of organisatie: Academisch Medisch Centrum
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 343362777
Straat en huisnummer: Meibergdreef 31
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM
IBAN: NL68RABO0136166741

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Datum:

17 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD18002017842

Over uw project

Geplande startdatum:

1 juni 2017

Geplande einddatum:

1 juni 2022

Titel project:

Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in

Titel niet-technische samenvatting:

Zenuwprickeling als therapie tegen chronisch darmontsteking ziekten

Naam DEC:

DEC AMC

Postadres DEC:

Meibergdreef 31

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:

Amsterdam

Datum:

17 maart 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag


AMC Crediteurenadministratie
Postbus 400
1115 ZJ 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
AVD118002017842
Bijlagen
2

Datum 17 maart 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 17 maart 2017
Vervaldatum: 16 april 2017
Factuurnummer: 170842
Ordernummer: Kostenplaats 

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD118002017842	€ 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: woensdag 29 maart 2017 14:36
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie AVD118002017842

Geachte [REDACTED],

Ik hoop dat u deze mail ontvangt omdat uw mailadres niet volledig is ingevuld in het aanvraagformulier.

We hebben net aan de telefoon gesproken over enkele onduidelijkheden in uw aanvraag met titel 'Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in rats and mice' en nummer AVD118002017842.

De vragen waren of het acute experiment in ratten wel of niet een terminaal experiment is. Zo ja, moet het ongerief van deze dieren in de bijlage dierproeven en de NTS worden aangepast. Daarnaast wordt u verzocht de reden om alleen vrouwelijke muizen in te zetten nader te onderbouwen.

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. Om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken ontvangen we uw antwoord graag uiterlijk maandag, 3 april 2017.

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

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: dinsdag 4 april 2017 8:57
Aan: Info-zbo
Onderwerp: RE: aanvullende informatie AVD118002017842
Bijlagen: bijlage [REDACTED].doc; CCD [REDACTED].doc; NTS [REDACTED].docx

Let op, in de bijlage bij de mail van [REDACTED] is een macro aangetroffen. Macro's kunnen misbruikt worden om malware op uw systeem te installeren. Open de bijlage alleen als de mail afkomstig is van een door u vertrouwde afzender. Verwijder anders de mail zonder de bijlage te openen.

Dictu Servicedesk

Hieronder staat de tekst van de oorspronkelijke mail :

Beste [REDACTED],
ik zag dat mijn reactie nog niet was doorgekomen (via mijn lokale DEC), en stuur je hierbij nog mijn aangepaste aanvraag voor de vergadering.
Het betreft een kleine aanvulling op de punten besproken:
1-acute experimenten betreffen geen terminale experimenten, maar de dieren komen nog bij van anesthesie
2-een extra toelichting op het feit dat we alleen vrouwtjes muizen gebruiken, omdat de ziekte in elke muis in kooi op verschillende tijdstippen inzet is de kans op vechten erg groot en dat beïnvloedt de uitkomst van de proef erg.

Hopelijk komt dit nog op tijd voor de vergadering, we hadden het telefonisch al besproken.

ik heb deze reactie ook naar de lokale DEC gestuurd dus die zullen het nog wel doorsturen.

[REDACTED], Meibergdreef 69 1105 BK Amsterdam |
[The Netherlands](#) [REDACTED]

Van: Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]
Verzonden: woensdag 29 maart 2017 14:43
Aan: [REDACTED]
Onderwerp: FW: aanvullende informatie AVD118002017842

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 29 maart 2017 14:36
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: aanvullende informatie AVD118002017842

Geachte [REDACTED]
Ik hoop dat u deze mail ontvangt omdat uw mailadres niet volledig is ingevuld in het aanvraagformulier. We hebben net aan de telefoon gesproken over enkele onduidelijkheden in uw aanvraag met titel 'Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in rats and mice' en nummer AVD118002017842.
De vragen waren of het acute experiment in ratten wel of niet een terminaal experiment is. Zo ja, moet het ongerief van deze dieren in de bijlage dierproeven en de NTS worden aangepast. Daarnaast wordt u verzocht de reden om alleen vrouwelijke muizen in te zetten nader te onderbouwen.

Stuur de ontbrekende informatie binnen veertien dagen na de datum van deze brief op. Om uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering te kunnen bespreken ontvangen we uw antwoord graag uiterlijk maandag, 3 april 2017.

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

Met vriendelijke groet,

██████████
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

AMC Disclaimer : <https://www.amc.nl/disclaimer>



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.
-

This project concerns fundamental and applied research questions.

The central hypothesis of this study is that intervening with neuronal innervation of lymphoid organs affects immune responses that are important in chronic inflammatory diseases (termed Immune-Mediated Inflammatory Diseases (IMIDs)). These responses include events such as lymphocyte trafficking and immune cell activation through pattern recognition receptors.

General goals of the research are to test and validate neuronal intervention techniques (i.e. denervation and stimulation) to treat chronic inflammatory diseases, such as Inflammatory Bowel Disease (IBD, or colitis, but we will refer to IBD for clarity throughout this text).

Rationale for this project:

Modulation of vagus nerve activity by stimulating the vagal nerve at cervical or subdiaphragmatic level has been demonstrated to affect immune responses in vivo: stimulation reduced systemic and local inflammation (Borovikova et al, Nature 2001; deJonge et al, Nat Immunol 2005), whereas denervation augments inflammation (Oliver et al, Eur J Immunol 2016). The mechanism underlying neuro-immune modulation is unclear and it is believed that a better understanding will allow novel treatment of IBD (reviewed in Willemze et al, Nat Rev Gastro 2015). Nerve activity can affect immune responses because of the neurotransmitter receptors that are expressed on immune cells. As lymphoid organs are intensely innervated by particularly sympathetic fibers, nerve stimulation can have broad immune modulating effects relevant for IBD pathogenesis, even without the need for direct innervation of inflamed tissue. Neurotransmitter receptor activation affects multiple immune cell functions, such as cell trafficking to lymphoid organs (Kanai et al, J Exp Med 2015), cytokine production, and pathogen phagocytosis and killing. All of these are relevant for IBD pathogenesis. Clinical trials of nerve stimulation to reduce inflammation are already underway (Bonaz et al, Neurogastro and Mot 2016) and are well received among patients (Zitnik, Ann Rheum Dis. 2011), underscoring the safety, feasibility and societal urgency of nerve stimulation using implantable devices to reduce inflammatory responses, i.e. the topic of this project.

For this project we choose IBD as an immune mediated disease for the reason that: 1) IBD is a relatively prevalent diseases for which a great unmet need for treatment exists, 2) clinical trials of vagal nerve stimulation have already been performed in IBD (clinical trial NCT02311660), (and rheumatoid arthritis; clinical trial NCT01552941) and show efficacy in ameliorating disease likely via reduction of macrophage TNF release (neutralizing TNF using anti-TNF is an end point therapy for these patients), 3) well established rat and mouse models for IBD exist. The latter supports the societal significance and potential clinical application of the proposed project.

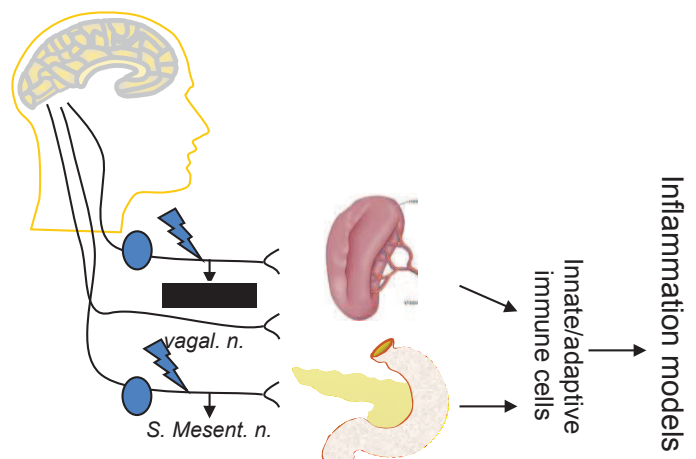
Our previous work in this area (Nijhuis et al, PLOS ONE 2013) and that of others (Martelli et al, J Physiol 2014) led us to assume that not only the vagal (parasympathetic) nerve, but also nerves of the sympathetic system are able to mediate immune modulation. In particular, nerves projecting to the [REDACTED] or [REDACTED] organs (Kanai et al, J Exp Med 2014) may mediate the modulation of the immune response by the vagus nerve. This was concluded from studies where [REDACTED] (removal of the

██████) abolishes the effect of vagal nerve stimulation (Ji et al, Muc Immunol 2014). Moreover, sympathetic neurotransmitters are more immune-modulatory than parasympathetic neurotransmitters (Nijhuis et al, PLOS ONE 2013). These data suggest that vagal nerve stimulation indirectly stimulates ██████ innervation (indirectly, because no direct connection in the coeliac plexus between vagus nerve and ██████ innervation was ever demonstrated (Martelli et al, Exp Physiol 2016), although vagal fibers may reach the ██████ (Buijs et al, PLOS ONE 2008). Irrespective, vagus nerve stimulation has very pleiotropic effects because of the many organs innervated by the vagal nerve. This project's aim is to show that direct stimulation of sympathetic nerve bundles to the ██████, or to the intestine, is a more effective approach than vagus nerve stimulation.

Nerve fibers to the ██████ are organized around the splenic artery, in a plexus around the artery. We will refer to this plexus as the ██████. Similar to ██████ stimulation, stimulating the output of the sympathetic innervation of the intestine, including intestinal lymphoid tissue via the **mesenteric nerve plexus** that surrounds the mesenteric artery, may be effective in the treatment of IBD. Sympathetic nerves that innervate immune cells in intestinal lymphoid tissue and mucosa can probably reduce IBD (reviewed in Willemze et al, Nat Rev Gastro 2015). Notably, the spleen and mesenteric lymphoid organs jointly mediate immune activation in IBD. See for a schematic illustration of neural routes Fig 1.

Because the neuro-modulatory intervention appears to be relevant for the therapy of IBD, we have designed nerve "cuffs" (devices that enclose the nerve to allow electrical activation of the nerve fibers) that can be implanted (see Fig 2 for an illustration of the cuffs). Such cuffs can also be used to stimulate the nerve plexus and include the artery that is attached to it, as described above. Our industrial partner GlaxoSmithKline Bioelectronics (now Galvani Bioelectronics) has the intention to bring such devices to the market for treatment and, therefore, supports this research.

Fig. 1. The proposed experimental setup. Specific nerves will be denervated or stimulated to affect chronic inflammatory disease.



The choice for rat and mouse experiments.

We have developed nerve cuffs to fit on the mesenteric, vagal, and splenic nerves over the past years. Because these initial nerve cuffs were relatively large and required a direct connection with external impulse generators, we used rats to implant the cuffs and test their ability to reduce IBD. In these experiments, chronically implanted electrodes were attached to adaptors that were cemented on the head of the rat to allow daily stimulation without the need for anesthesia. These implanted devices delivered proper pulses to the targeted nerve for over 21 days. The nature of electrical stimulation of the nerve bundle (i.e. the settings of the impulse generator) is important for the response to optimize the ratio of the desired (anti-inflammatory) and unwanted effects (e.g. altered perfusion of the organ). Because of our experience with the rat IBD model, stimulation parameters such as impulse frequency (1-20 Hz), applied current (10-200 μ A), and pulse duration (10-1000 μ sec) can be optimized without the need for first adapting the system to the experimental animal (a mouse is 10x smaller than a rat).

Rat models for IBD are less well developed. In contrast, various mouse models for IBD are available to better study aspects of IBD that are relevant to human IBD (a discussion of rats and mice as experimental models for IBD can be found in te Velde et al (IBD 2007) and Zeeff et al (IBD 2016)). Furthermore, mouse models offer additionally the availability of genetically modified strains that allow intervention with the expression of specific genes (e.g. neurotransmitters and their receptors) and the

tracing of cells. Moreover, more reagents for analyses, such as antibodies for complex FACS sorting panels, are available for mice. These complex FACS sorting experiments are necessary to identify which cells respond to nerve stimulation in the targeted organ. We, therefore, plan to switch to mouse models for IBD once we have characterized the electrical settings and responses of the implanted cuffs in rats.

Summarizing, we aim to:

- 1) Optimize the implantation and stimulation protocol for nerve bundles (splenic, mesenteric, and vagus nerves) in rat, extending earlier work;
- 2) Test the proof-of-concept of the efficacy of nerve bundle stimulation to reduce disease in rat models of IBD;
- 3) Implement the use of smaller, more appropriate, cuffs in mouse models of IBD that will allow us to better understand the mode of action and thus improve their efficacy by targeting the specific mechanisms that are responsible for the effects. Such implementation also requires smaller head mounts, with which we have already experience via working with our industry partner in this project.

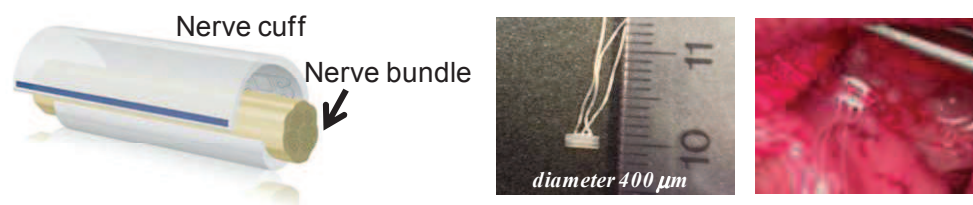


Fig 2. The implanted cuff electrode that will be used for this research. Left panel: nerve cuff, middle panel: illustration of the cuff and its size. Size ranges of 100-500 micrometer will be used depending on nerve diameter. Right panel: illustration of a nerve cuff (prototype) that we plan to use to electrically stimulate a nerve bundle (or plexus) (example: the splenic nerve plexus around the splenic artery).

Rat IBD models. We have experience with IBD models in rats and mice. In rats, we will use the DSS (Dextran Sulphate Sodium)-induced IBD model. In this model DSS is administered via the drinking water and causes damage to the epithelial layer of the colon that, in turn, causes an innate immune cell-driven response in the underlying mucosa leading to IBD.

Mouse IBD models. In contrast to the rat model, mouse models for IBD, including acute and chronic DSS-induced colitis, 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)-induced colitis (TNBS is a hapten that causes a T-cell-driven colitis), and CD45Rb^{high} transfer colitis (transfer of pathogenic T-cells to an immune-compromised host) allow molecular analyses of the immune responses.

Why testing of different mouse models for IBD? The etiology for human IBD (Ulcerative colitis nor Crohn's Disease) is not clear. Maybe for that reason, no specific model human IBD exists. However, the different rat/mouse models described in this project allow us to study different aspects of human IBD, for instance the DSS model is driven by innate pathways, the Tcell transfer model reflects a T cell driven IBD. Such multiple analyses allow modeling of clinically relevant aspects of human IBD, such as the involvement of innate and adaptive immune cells, ulcer and wound healing, barrier function, and involvement of cytokines such as TNF. The combination of mouse models of colitis is, therefore, well suited to study the mechanisms by which neuronal stimulation affects colitis.

It is important to note that these models are very dependent on the microbial status of the animal facility. As the AMC animal facility is just reconstructed and will be re-colonized from mice lines re-derived from other breeders, we need to optimize the conditions for the colitis models. This holds for the acute and chronic DSS-induced colitis, TNBS- induced colitis, and CD45rbhigh induced colitis.

Denervation and stimulation of nerve bundles in IBD models. Specific cuff electrodes to stimulate vagus nerve, and the splenic and mesenteric plexus in the rat will be used (Fig 2). Nerve activity will be blocked via surgical denervation. Stimulation and denervation of nerves is anticipated to ameliorate and augment inflammation, respectively, because of the anti-inflammatory effects of vagus nerve stimulation in septic models. However, amelioration of inflammatory disease by nerve activation is not always evident; inflammation involves many actors beyond cytokines, and it will also be relevant to reduce

neuronal activity to achieve modulation of the course of disease, such as shown for modulation of inflammation via the carotid body, which requires inhibition of nerve activity (Sacramento et al, 2016). So the combination of nerve denervation/stimulation will allow a full understanding of the modulation of the inflammatory process, and therefore we include stimulation and denervation experiments in this project. In addition, stimulation of different nerve bundles innervating lymphoid organs, i.e. those in the gut or [REDACTED], or stimulation of the vagus nerve, may be effective in reducing IBD because a general intervention in the immune response is anticipated.

Optimization of the electrical stimulation in disease models. The protocol for electrical stimulation of the nerve bundle needs to be optimized for current, voltage, and pulse duration and frequency. In particular, we need to quantify and optimize the electrical signal delivered to the nerve bundle in its efficacy to affect immune cell activation, such as [REDACTED]. Therefore the strategy of this project is to optimize the surgery, pulse choice etc in a rat model, before moving on to mouse models, as outlined in Fig 3.

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?

The central research question is whether intervention with the function of (para)sympathetic nerve bundles can affect the course and pathogenesis of IBD.

Specific research questions:

1. What is the efficacy of selective stimulation of vagal nerve bundle (parasympathetic), mesenteric plexus (sympathetic), or [REDACTED] [REDACTED] (sympathetic) on the course of IBD. We will use nerve denervation by surgical techniques to show the opposite effect of nerve stimulation.
2. What is the mechanism of action of the intervention (experiments in mouse models of IBD).

Feasibility of the studies.

Given our prior work and experience with the surgery, the proposed work is feasible within the 5 years timeline. Although many mechanistic questions around neural immunomodulation remain to be answered even following this project, proof of principle of nerve stimulation/denervation to modulate inflammation can be provided in the project time. It should be noted that strict mechanistic experiments, such as neurotransmitter receptor functions and [REDACTED], can be subsequently addressed in in vitro experiments.

The team (2 FTE lab technicians and 2 postdocs) is well trained in animal surgery. GSK Bioelectronics will take care of the nerve cuffs and stimulators.

3.3 Belang

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

Societal interest: Chronic disabling conditions associated with IBD adversely affect patients in terms of physical suffering and pain, impaired function, and diminished quality of life. These persistent relapsing diseases have a significant influence on individual employment status and work-related productivity. In addition, IBD represents a sizable burden on society due to high healthcare and non-healthcare related costs. IBD, which comprises Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), affects about 0.1% of the Western population. IBD affects youth at their prime of life, causing diarrhea, intestinal bleeding, and severe gut discomfort.

So-called biologicals (e.g. monoclonal antibodies and recombinant proteins directed against pro-inflammatory cytokines (like infliximab), or anti-integrin (vedoluzimab) have been demonstrated as very effective. However, none of the novel therapies has induced a lasting remission. Hence, IBD treatment represents a large unmet clinical need.

Scientific interest: It is only recently that we begin to appreciate the role of innervation of lymphoid organs, such as spleen and lymphoid follicles in the gut. This project wants to explore the possibilities of the neuronal routes to intervene with inflammatory processes, with a focus on IBD. We have already shown that denervation affects the course of intestinal inflammation. The clinical potential of employing neuronal signaling to restore immune balance in the gut is evidenced by the success of ongoing clinical trials of vagal nerve stimulation (VNS) in rheumatoid arthritis (Koopman FA et al, PNAS 2016), and IBD (Bonaz et al, J Physiol 2016). However, the VNS is not only invasive, but also crude (it stimulates the large cervical portion of the vagus that contains both efferent and afferent cholinergic and adrenergic nerves projecting the entire body), and is not based on an appropriate mechanistic concept of action to allow improvement. For instance we showed that the immune cells in colonic mucosa (in IBD) are not directly innervated by the vagus nerve (Cailotto et al, Neurogastro and Mot 2011), so any clinical effect sorted by VNS is by definition indirect. This lack of understanding of the neuronal effector pathways and targeted immune cells hampers further improvement of efficacy of the treatment.

This project will address this issue by stimulating the nerves at a site more distal to the (immune)organ such as [redacted] and intestinal gut-associated lymphoid tissue, rather than the crude cervical vagal nerve stimulation tested thus far. This with the aim to reduce immune cell activation relevant in IBD. Denervation and stimulation experiments will establish proof of concept for nerve intervention to affect disease course in IBD models. Transcriptional and cellular analyses of immune cells in the targeted tissue will allow titration of the signal. Preclinical analyses are geared towards human spleen innervation. The aim of those studies is to test a prototype for human [redacted] stimulation in a pilot IBD patient population. In this project, GSK Bioelectronics and AMC collaborate closely, which will leverage the development of an effective device for use in human IMIDs greatly.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

General strategy of experiments;

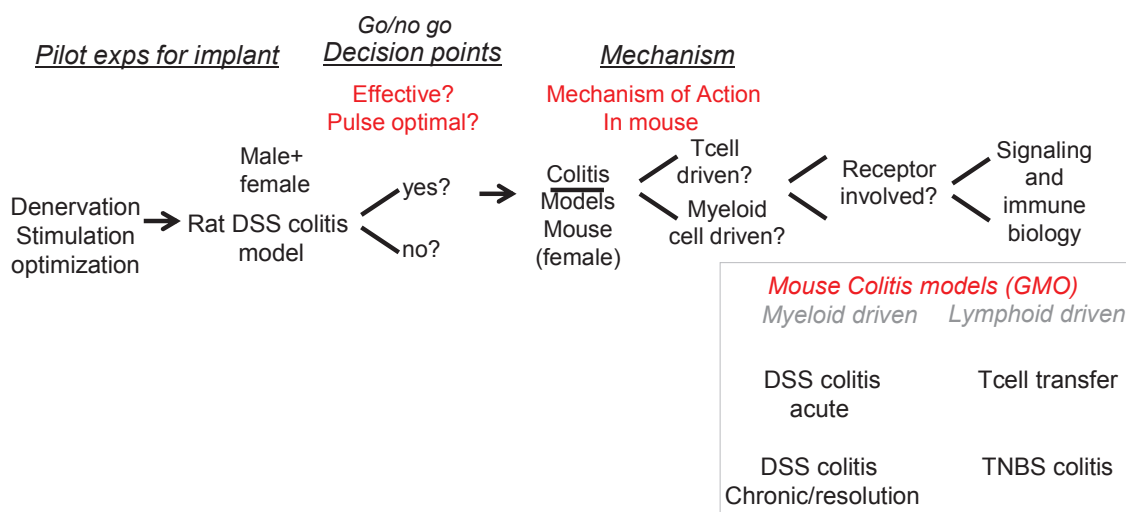


Fig. 3. Strategy of research, including indications of go/noGo points. First, pilot experiments in rat will allow us to pinpoint intervention points in three different nerve bundles (vagal nerve, mesenteric nerve, splenic nerve). Experiments will be performed to optimize implantation, denervation, and optimal stimulation parameters in acute stimulation experiments in rat. Next we will test efficacy of stimulation in IBD models in rats. In mouse IBD models, female mice are described to be the gender of choice. If stimulation is effective on reducing IBD, the next will be to move to (GMO) mouse models of myeloid- or lymphoid-driven IBD to determine the mechanism of action.

Key objectives and decision points:

- 1-** to establish an optimal stimulation protocol for a nerve-bundle or plexus to reduce immune cell activation (by means of stimulation of vagal, mesenteric, or splenic nerve)
- 2-** to apply this stimulation in models of IBD in rat to evaluate the inflammatory response that causes disease and to decide on the stimulus given in mouse models in objective 3
- 3-** to decipher the mechanism by which stimulation acts on the disease course in mouse models of IBD

Ad 1- optimization of the parameters and surgery of the stimulus given. The stimulation paradigm will be varied (1-frequency, 2-current strength, 3-pulse duration, and other potential parameters that can be determinants in the effective immune-modulation). Optimal stimulation will be determined according to blood flow changes in targeted tissue, as well as measurement of neurotransmitter release, and local cytokine release measurements.

Specific procedures to optimize the parameters of electrical stimulation.

In earlier studies in human, effects of vagal nerve stimulations on the immune response were measured by determining cytokine secretion in blood cells ex vivo stimulated with LPS (Koopman FA et al, PNAS 2016)). Similarly, we will optimize the effects of nerve stimulation on 1) cytokine release in ex vivo stimulated cells from different organs, and 2) acutely after stimulation in vivo. To do the latter, the animal will be injected intraperitoneally with an immune challenge (LPS or other immune stimulator) after a nerve bundle was stimulated (under anesthesia), and immune cells will be collected from peripheral blood or lavage fluid and immune response measured. We aim here to determine the optimal electrical stimulation parameters that affect immune responses relevant to IBD.

Control animals for baseline measurements and sham-stimulated animals are required to ensure that preparing and "cuffing" the nerve alone does not give the same/more/less neurotransmitter release.

Go/no Go: not applicable, the optimal stimulation will be used.

Ad 2- Chronic stimulations of (para)sympathetic nerves using implanted devices. In previous research we have constructed effective cuff electrodes for use in **rat**. For instance, we have adapted these electrodes to fit the superior mesenteric nerve bundles. A similar strategy will be applied for other nerve bundles, such as ████████ and vagal nerves. Gender of Rat/mice; earlier data in mouse colitis models demonstrate a more reproducible outcome in female mice (for reasons outlined in Bijlage), favoring the use of female mice in colitis experiments (fig 4). Generation of disease symptoms will cause fighting behavior and additional stress factors in male mice, compared to female, which will directly affect the outcome of these experiments. We will use both male/female in rat IBD experiments.

Nerve stimulation in inflammation models: After implantation and recovery stimulation will be performed daily in IBD models for specific time intervals. Specific stimulation parameters (amperage, frequency, time) will be determined for each experiment and provided in the WP-IVD protocol. Details are in the bijlage.

Nerve denervation experiments. We aim to apply selective nerve denervation surgery and assess the effect of specific immune processes mediating IBD. Details are in the bijlage.

Go/no GO decision points: effective reduction of disease in rat IBD. Lack of effect of either nerve stimulation in rat models will be a no-go point to carry out experiments in mice. The ineffective reduction of IBD symptoms in rat models after stimulating a specific nerve will be a no-go for experiments in 3.

Ad 3. Mouse models of colitis. These will be carried out based on the findings on gender (favoring female as in point 2), stimulation, and nerve(s) determined in 2.

Go/no Go decision points: not applicable in this stage, we will use the stimulation, type of nerve, and gender as deduced from 2

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

The strategy of experiment (see also Fig 3). As outlined above, our strategy is to first establish the surgical method and parameters for stimulation in rats because of their size. These experiments will determine gender, type of nerve, and stimulation parameters to be used.

As mouse models for IBD provide better tools to gain insight into the mechanism of action (reviewed in te Velde et al, IBD 2017), we plan to analyze the working mechanisms in mice.

If the (chronic) implantations in rats are successful, implanted cuff electrode and denervation techniques will be adapted to mice to deduce the mechanism of action of efficacious stimulation/denervation protocols.

In general, we have chosen for a staged format of experimentation, **first** optimizing the implantation studies, nerve bundles, and stimulation protocols, **next** determining efficacy in proof of concept experiments in rat, and **third**, to transfer such implanted devices to mice to determine their mechanism of action.

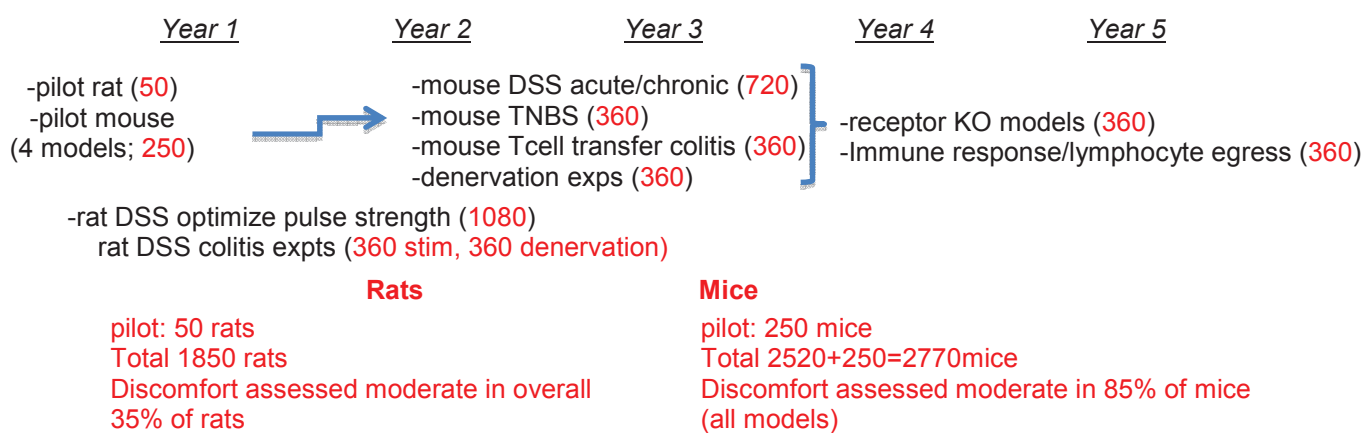


Fig 4. Strategy of experimentation and estimated number of rats and mice used, including assessment of the percentage of those animals suffering discomfort (in red). Numbers mentioned include a pilot phase of experimentation (in red indicated) where we need to establish the IBD models in our new animal facility. For calculation of number of mice/rats and experimental groups please refer to the bijlage.

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.

Research strategy: See also figure 3.

1-Optimization. Nerve stimulation and denervation protocols will be tested in rats, since we have most experience with this model. Using rats instead of mice will avoid a learning curve, which would affect the optimization of the protocol.

2-Proof of efficacy. For the same reasons as stated under 1), we will establish the efficacy of nerve stimulation and denervation protocols in rat models of IBD.

3-Mechanism of action. The availability of rat models of IBD are restricted to DSS. Once we have optimized the protocols, we will therefore turn to mouse models of colitis that are better to tease out mechanism of action.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	intervening with neuronal signaling in rat and mouse experimental IBD
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.	11800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Academic Medical Center	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>		Intervening in neuronal signaling to lymphoid organs in models for inflammatory bowel disease (colitis)

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

The rationale for this project is that immune cells express receptors for neurotransmitters and are functionally affected by neurotransmitters in vitro and in vivo. To achieve immunomodulation, we will intervene with neuronal activity by using cuff electrodes that can be implanted. We will test its effect on models of IBD by electrical stimulation of the vagus nerve or the sympathetic periarterial plexus that innervate the ██████████ or intestine.

Rationale for the experimental setup.

In this project we will address denervation and stimulation of nerve bundles. Choices for neuronal interventions will be based on the optimisation of electrode cuff devices that can be implanted around particular nerve bundles to stimulate the nerve output. The optimal stimulation to achieve a desired effect on immune cells will be determined. The effect of such stimulation will then be assessed in models of IBD.

The experimental setup of experiments is as follows:

1. establish an optimal stimulation protocol for the vagal, mesenteric, or ██████████ to reduce immune cell activation via acute stimulation experiments in anaesthetized rats.
2. apply this stimulation protocol in rat models of IBD to assess the reduction in the inflammatory response that causes disease to identify the nerve
3. establish the mechanism by which nerve stimulation affects the disease course in mouse models of IBD

The models for IBD. To study the mechanism of action of neuronal innervation affecting colitis we propose the following models.

A. two chemically induced colitis models:

1-acute and chronic Dextran Sodium Sulfate (DSS) induced colitis, used in mice and rats.

2-2,4,6-trinitro benzene sulfonic acid (TNBS) induced colitis (mice).

In the DSS model, rats or mice are subjected several days to drinking water supplemented with DSS, which is directly toxic to colonic epithelial cells of the basal crypts. DSS also interacts with the mucus charge allowing luminal bacteria to directly interact with epithelia, causing an innate mediated colitis. In the TNBS model, colitis is induced by intrarectal administration of the covalently reactive reagents TNBS, induces a T-cell-mediated response against hapten-modified autologous proteins/luminal antigens.

B. a T-cell driven colitis model (mice):

3-the CD45^{rb}^{high} T cell transfer model of colitis is the most widely used model to study the initiation, induction, and regulation of immunopathology in chronic colitis that is mediated by T cells. A number of mouse models are available to assess the contribution of T cells in the pathogenesis of IBD.

Primary outcome parameters:

The mouse and rat models of colitis display variable degrees of similarity with human IBD: they lead to weight loss and wasting disease, colon inflammation, and lesions in the epithelium. Some models are more driven by innate immune cell activation in the bowel (DSS-induced colitis) and others are more dependent on delayed type hypersensitivity reactions (TNBS model) or T cells (Tcell transfer colitis models).

Clinical outcome parameters. Weight, diarrhea, colon length/weight, spleen weight, and endoscopy score are established outcome parameters of colitis.

Molecular outcome parameters for inflammation. Colitis is assessed by measuring cytokine/inflammatory mediator expression and protein release, and by scoring histological indicators for colitis in the colon. Furthermore, we have shown that the blood supply of the intestine allows a constant flow of immune cells to enter the tissue, which consists of different compartments i.e. intestinal muscularis, lamina propria and mucosa. The migration of these immune cells into the intestine is under the control of adhesion molecules (VCAM, ICAM) allowing the cells to be retained in the intestine, and of various chemokines (CXCL13, CCL19, CCL21) produced by stromal cells present in each compartment. The expression of such chemokines depends on the immune challenge, and leads to the retention of immune cells from the blood vessels in the intestine. Hence it is important to monitor expression of these molecules in our models of IBD, as immune cells and stromal cells receive neuronal information that can alter their activation status.

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.

Optimizing the nerve stimulation rat:

Acute stimulations (stimulation of the nerve bundle under anesthesia and analyses in tissue thereafter (<6h):

1-Cuff electrode design and testing of stimulation paradigm in rat. A consortium consisting of neuroscientists, engineers (Cambridge University), CorTec corporation, and researchers in the AMC have developed specific cuff electrode probes to stimulate sympathetic and parasympathetic nerves. The intervention is as follows: Rats are placed on a proper heat mat and electrodes are positioned on the vagal nerve via an incision in the neck. The diameter of the cuff electrodes is 50-600micrometer, dependent on which nerve is to be targeted. The nerve is located and stimulated with a hook, cuff, or implanted device. The stimulator equipment can deliver for instance 200microAmp current with a frequency of 10Hz and a pulse duration of 2 ms, and delivers these signals for 15 min, 2hr, 4hr or 6hr. The rats are then sacrificed at the time point chosen within 6 hrs after pulse delivery (the animals recover from anesthesia for surgery), and tissue is collected for various measurements. Control animals for baseline measurements and sham stimulated animals are required to assess the effects of preparing and manipulating the nerve alone.

The effect of stimulation of the nerve bundle in the acute setting will be evaluated as follows:

-Multiple stimulation settings (frequency, amplitude, and duration of the pulse) will be applied and optimized by measurement of blood flow changes in the targeted organ, and by changes in the production of inflammatory mediators in the targeted organ and in whole blood assays performed *ex vivo* after LPS stimulation (as established earlier (Levine et al, PLOS ONE 2014; Koopman et al, PNAS 2016)). An optimized stimulation is aimed, meaning a stimulation that affects immune response parameters without affecting blood flow/perfusion through the tissue.

-We will test the response of nerve stimulation to an injected immune challenge *in vivo*, i.e. LPS by intravenous or intraperitoneal injection. Blood cytokines and other indicators of immune activation will be measured shortly thereafter.

These above described acute experiments, where nerve stimulation setting will be tested in anaesthetized rats to assess appropriate settings for stimulation, can be regarded as pilot experiments for the current chronic stimulations where implanted devices are to be used.

Implantation of electrodes for chronic stimulation in rat.

The right placement of electrodes in rats was tested previously in anesthetized rats (terminal experiments) in earlier approved DEC protocols. We are now able to locate the nerve and successfully stimulate it, and established the best way to tunnel the wires to the back of the head and attach them to the skull. After implantation and recovery, the nerve will be stimulated daily (during DSS experiments). Specific stimulation parameters (amperage, frequency, time) will be determined for each experiment and provided in the WP-IVD protocol.

Implantation of electrodes. The right placement of electrodes in rats has been tested previously in anesthetized rats (terminal experiments). We are able to locate the nerve and successfully stimulate the attached nerve and established the best way to tunnel the wires to the back of the head and attach to the skull. We have trained ourselves for the operation in an earlier approved IVD protocol.

Experimental approach nerve denervation rat/mouse.

Alternatively, we will denervate nerves in IBD models to demonstrate the reverse effect to stimulation. Denervation will be performed on similar nerve bundles as those stimulated, but not per se similar location on the bundle, because we may be able to denervate more distal to the target organ whilst stimulation may not be possible at that location, due to anatomical difficulties to place the cuff.

Nerve denervation of the **vagus** nerve can be achieved by cutting the right celiac branch of the vagus nerve, as previously described (Costes et al. 2014). Denervation of the **pancreas** and/or **colon** and **ileum** is performed by "cleaning" the mesenteric artery or splenic artery from the attaching nerve tissue. The effectiveness of this latter procedure as determined by Mass Spec analyses of spleen tissue is around 80% in rats and mice (earlier DEC protocols).

Selective denervation of the nerves to the **pancreas**/small intestine/lymph node/colon is performed by cutting the nerve bundle/plexus to be targeted, as previously described (Cailotto et al., 2012). Selective denervation of the nerve bundles/plexus surrounding an artery (the **pancreas** or mesenteric artery) is performed by "cleaning" the adjacent tissue of these arteries from nerve tissue. Vagal nerve and sympathetic nerve denervations will be performed as described earlier (Oliver et al, Eur J Immunol 2016).

Rat colitis models:

DSS colitis: Once a stimulation protocol for a nerve has been optimized, we will evaluate the effects of nerve stimulation or denervation on the clinical course of colitis. The rat is the initial model of choice because of the size of the nerve bundles and because we have gained pilot experience in setting up the DSS colitis model in the rat. In pilot experiments, we have established the optimal concentration of DSS and time span over which the colitis develops in rats (7 to 9 days).

If the outcome of the experiments in rats is promising, we will apply these protocols to mouse colitis models.

Mouse colitis models:

DSS colitis: From our experience with DSS colitis in mice, we expect that the animals will show a loss in body weight after 3-4 days of exposure. The concentration of DSS and exposure time affect the inflammation in the colon. As inflammatory readout, the disease activity score (endoscopic assessment, clinical features of colitis), histological examination and pro-inflammatory cytokines expression in colonic

tissues will be used. The DSS colitis will be performed in **acute** setting (7 days DSS) or in a recovery context (5 days of lower dose of DSS, with a recovery period of up to 35 days ("**chronic model**" as in Olivier et al, European J Immunology, 2016).

Tcell transfer colitis: Transfer of FACS-sorted CD4⁺CD45RB^{high} T lymphocytes of a healthy donor mouse to an immune-incompetent SCID (of RAG-1 of -2 knock-out mouse, is a well validated model for T-cell dependent inflammatory colitis. Transfer of sorted CD4⁺ Tcell generates colitis due to the lack of regulatory Tcells in the transferred population. The mice develop colitis over a longer time course (6-9 weeks) which mimics well the human chronic course of IBD. Gene expression analyses of Tcell transfer colitis tissue and human IBD tissue was reported to show similar gene pathways indicating similarity of the immune process. This model, therefore, allows us to evaluate the function of neuronal innervation of lymphoid organs in Tcell activation, because 1) the role of Tcell activation can be studied appropriately in 2) a chronic colitis model with good resemblance to human IBD. Because 3) donor Tcell to be transferred can be derived from GGO mice, e.g. adrenergic receptor-deficient mice, the role of these (adrenergic) receptors in the disease process can be determined.

TNBS colitis: TNBS colitis is induced via intrarectal administration of TNBS, in 40% ethanol, which induces a type IV hypersensitivity reaction. The ethanol is used to trigger a transient intestinal barrier disruption to allow the TNBS to act as a hapten. The reaction triggered is a typical Th1 Tcell response seen in many IBD patients, especially as seen in patients suffering from CD.

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

Power calculations of all models in which the **pulse will be optimized** (80% power with a significance level of 0.05) will be based on the improvement of the primary outcome parameter of reduction of cytokine release in tissue and blood after stimulation of 40% and SD values around 30%. A quantification of secreted cytokines will be carried out in the supernatants of cultured splenocytes, tissues cells, or blood cells as primary read out for efficient stimulation. References describing this effect on which these numbers are based on are Picq et al, PLOS ONE 2013, Meregnani et al, Autonom. Neurosc. 2011, and Levine et al, PLOS ONE 2014 (the latter in a model for rheumatoid arthritis in which similar reduction of disease is seen after vagal nerve stimulation).

Power calculations of all models in which **an implanted stimulation device is used** or where denervation is performed (80% power with a significance level of 0.05) will be based on the improvement/worsening of the primary outcome parameter of histological scoring of colitis of 40%. To illustrate this, our experience with previous colitis experiments has indicated that an improvement of histological score or 40% can be regarded as significant improvement. This is for instance exemplified in published studies from our group (Snoek et al, Br J Pharmacol 2010), where neurotransmitter agonist molecules are tested in DSS and TNBS-induced colitis models. Disease Activity Index (DAI; Ten Hove et al 2010)) in these experiments is dictated by histological improvement at a score interval 0-3, was observed in experiments of n=10, with app. 30% SD values. We recently reproduced similar DAI improvements in pilot experiments in rat DSS colitis (unpublished-Willemze et al) using 10 rats per group. Similarly, we have produced a worsening of outcome by 40% in this group size of 10 upon **denervation**. Relevant references in which denervation is described are Levine YA et al, PLOS ONE 2014, where vagal nerve stimulation was tested in models of rheumatoid arthritis, and Olivier et al, Eur J Immunol, where effect of denervation was tested in chronic models of colitis, although cytokine production was not the primary outcome parameter in this study.

To determine the expected number of experimental groups to be used in each colitis model (rats or mice) will be dependent on the model used. In general, we envision experimental groups as follows (6 groups per experiment). First, a cuff implant or denervation surgery is performed, after which a minimum of 10 day recovery period is allowed. Next the following groups are assigned; 1. Mice or rats, untreated, no colitis; 2. Mice or rats, treatment; no colitis; 3. Mice or rats, no treatment, colitis (either DSS or TNBS induced, or Tcell transfer colitis); 4. Mice or rats, treatment; colitis (either specific nerve bundle stimulation or denervation); 5. intervention group 1, colitis; no treatment and 6. Intervention group 2, colitis; treatment (either specific nerve bundle stimulation or denervation). In these experiments, the power will be determined expecting a significant improvement/worsening of histological score or cytokine/mediator release.

B. De dieren

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

-numbers foreseen in pilot experiments. We will determine the optimal conditions for colitis models, given the new facility that was just reconstructed. This new facility has a new microbial status and housing conditions that influence the colitis, so we need to test our models. These pilots will be done in all colitis models mentioned (rats DSS, mouse DSS, TNBS, CD45rb transfer colitis). We expect to need 5 experimental groups in which different conditions need to be tested in groups of 10 rats/mice. In total: rat DSS: 50, mouse DSS acute: 50, DSS chronic: 50, TNBS: 50, CD45Rb transfer, 50 RAG1-/- and 50 Tcell donor mice. In total we need 50 rats and 250 mice.

Animal species, origin, age and gender.

- Next, in our optimized rat experiments with DSS colitis we will decide which sex is most responsive, in case no gender difference is seen in rat, we can use both genders.

- The rat is the initial model of choice because of its 10-fold larger size compared to mouse.

- The mouse is the animal of choice because good colitis models exist and genetically modified mice are available. In mice colitis models we will only use female mice for colitis models as male mice have been shown to display stress and fighting behaviour which affects the outcome of colitis as described earlier (see article: <https://www.ueg.eu/education/latest-news/article/article/mistakes-in-mouse-models-of-ibd-and-how-to-avoid-them/>). In particular, male mice will fight because the colitis will set in at different time points for each mice individually in the cage. In the T-cell transfer model both male and female mice are used but in general, DeVoss and Diehl (DeVoss J and Diehl; Toxicol Pathol 2014; 42: 99–110) recommend using female animals if possible. They indicate that male animals are more prone to display aggressive behavior resulting in fighting, with the resulting stress and wounds potentially having a negative impact on a study. As said, this is also our own experience.

- Wild type and genetically modified mice (for instance adrenergic receptor-deficient mice (stock number 003810) are available from Jackson Laboratories.

- Mice will be used between 7 and 16 weeks of age (we aim to use young adults mice of 7-16 weeks but to obtain sufficient group sizes of e.g. SCID mice, we may have to deviate from the 7-16 weeks age group and use older mice).

- Genetically modified mice will be bred in the Animal facility of the AMC, whereas wild-type mice will be purchased from licenced companies like Charles River or Envigo, or when possible bred at AMC facilities. The proposed mouse strains/lines are already available.

Numbers of rats/mice: For rat and mouse DSS colitis experiments we expect to perform max 6 experiments per year with group sizes that need to be determined exactly, but based on historical data a group size of 10 rats and 6 experimental groups, amounting to 60 rats per experiment.

Similarly, we expect to need 10 mice per group in further experiments, and a standard experiment has 6 experimental groups thus a total experiment is done with 60 mice per experiment. The project runs for 5 years but we will be expected to need to do 6 experiments per year, as outlined in fig 4 in the protocol.

RAT experiments:

1. Pilot IBD: optimisation IBD model due to reconstruction mouse facility: we need 50 rats

2. Pulse optimisation: we need the following number of rats: we will optimize frequency (1), pulse duration (2) and current strength (3), and combinations thereof (4-6). Hence we anticipate to need 6*60 rats testing per nerve (SMN, vagal) so 3*360=1080 rats for optimisation. **So** total rats used for optimisation of the pulse will be max **1080**.

3. Number of rats needed for implant and experimental testing of the optimized pulse in rat IBD model.

We anticipate the testing of stimulation of the pulse in 2 groups of 60 rats =120 rats in 3 nerves is **360** rats.

Number of rats needed for denervation, once we have optimized the pulse on 3 nerves: **360**.

So total number of rats we anticipate to need: 50+1080+360+360=1850 in total

MICE experiments:

1. pilot IBD models due to reconstruction of animal facility: we need 250 mice.

2. Numbers of Mice needed in stimulation/denervation exps. As outlined in Fig 4 in the project, for 4 different models of IBD we need 4x360=1440 mice. This figure is built up as follows: per model, 3 nerves to test with an optimized pulse in groups of 60 mice: 180, 3 nerves that are denervated in groups of 60: 180; so 360 mice per model, 4 models: **4*360=1440** mice. For receptor KO models we need additional groups of 60 mice in 4 models, to be tested in 3 nerves (**720**) mice, for immune response/immune cell egress experiments we anticipate to require 360 mice as we will not test this in all models.

So total mice used for experiments is 7x360mice=**2520**.

So total number of mice we anticipate to need 2520+250=2770 mice in total.

Given our staged experimental design, we may choose to use one colitis model in mice that proves to be responsive in our stimulation experiments, and we may not test the intervention in all mouse colitis models. The latter will reduce the number of mice needed for the colitis experiments.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

X 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" The aim of the current project is to study the extent to which neuronal innervation can be modulated to ameliorate the inflammation. To mimic the complex interplay between cell types (neuronal cells, but also cells in the lymphoid follicles, and intestinal mucosa), we need to perform the colitis experiments in which this interplay is studied in rodents. Unfortunately, such interactions require an intact organ system, and cannot be studied in vitro.

"Verfijning" Logically, to minimize animal discomfort as much as possible, we will employ anaesthesia (as indicated above in the description of the procedure), whereas we will monitor the rats/mice for any sign of discomfort and mice with too much discomfort (thus reaching the humane endpoint; see at point J below) will be sacrificed. To further refine the experiments, rats/mice are housed in groups (if possible) in enriched cages with appropriate bedding and free access to food and water. The fitting of electrode connectors with an aluminium cap placed on the head allows social housing of rats as we have already established. Moreover, we will enhance the chance of successful animal experiments by first optimizing electrical probe (cuff) placement and stimulation in rat, before moving to mice, so that strictly mechanistic studies can be performed in mice in a pre-optimized setting. Another point of refinement is that optimisation of the enervation of the nerves will be performed under complete anaesthesia (rats will not recover after the experiment) before progressing to the IBD model experiments.

"Reducing" To reduce the number of mice and rats to be used, we will adjust the (minimal) necessary group size in subsequent experiments, based on earlier studies in our group in similar models and similar interventions in the neuronal system (Snoek et al, Br J Pharmacol, 2010).

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.

As indicated above, we will use anaesthesia and pain killing during pre-surgical placement of the cuff or denervation. To avoid effects on the environment we will strictly follow the D-I guidelines for animal experiments (which will be performed in a high health-status, restricted-entry barrier facility of the AMC). More importantly, our staged approach allows us to assess colitis in different colitis models and we have the opportunity to choose the model that is most consistent in its effect but also has the least morbidity to the animals.

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.

At least once a week, we perform extensive literature analyses (using PubMed with search terms "mucosal immunology", "sympathetic innervation", "parasympathetic innervation", " colitis" and "macrophages". Furthermore, we regularly visit scientific meetings to avoid performing experiments already performed before. The fact that the current project has recently been funded after international peer review suggests that the experiments are indeed novel (and scientifically important).

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.

During denervation/implantation we will use analgesics pre and up to one day postoperatively.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Event	Group	discomfort	Duration
Anesthesia	all	light	Minutes
Surgery placing stimulation electrode	all	none	120 min
Denervation surgery			45 min
Recovery from anaesthesia	all	moderate	Hours but pain medication for 2 days
Colonoscopy under isoflurane (various time points during colitis; to be specified in WP-IVD)	all	moderate	3 min
Stimulation nerve	All except controls	Light	5-10 min per day in cage
Colitis induction	all	mild Moderate	Up to day 6 Up to day 35
Sacrifice	all	Terminal	Very brief

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Colitis will give an inflammation in the intestinal mucosa, which likely will cause pain as seen in patients

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

We monitor the rats and mice and will sacrifice animals as soon as humane endpoint are reached.

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.

To be expected humane endpoints

Both after the surgery required to implant the cuff electrodes, and after the colitis-induction, the following humane endpoints will be taken into account: Weight loss higher than 20% of starting weight, retaining diarrhea after 2 days following surgery, abnormal behavior (isolation, aberrant activity and/or mobility, clear piloerection).

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

Hard to say, based on experience 5%

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.

- Implantation of cuff electrode and head mount → under anaesthesia → mild discomfort
- Recovery from anaesthesia → moderate discomfort
- injection Tcells → mild discomfort

- Colitis model → moderate discomfort
- Stimulation of cuff electrode, including handling → mild discomfort

Rats:

1. IBD model optimisation, n=50, discomfort moderate
2. optimisation enervation, n=1080, discomfort mild
3. IBD model with nerve stimulation/denervation, n=720 of which the control group will undergo mild discomfort (n=120) and the experimental groups will undergo (maximally) moderate discomfort (n=600). Overall, 35% of rats will undergo moderate discomfort.

Mice:

1. IBD model optimisation, n=250, discomfort moderate
2. IBD model with nerve stimulation/denervation, n=2520 of which the control group will undergo mild discomfort (n=420) and the experimental groups will undergo maximally moderate discomfort (n=2100), Overall 85% of mice will undergo mild discomfort.

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.

In addition to endoscopic and clinical parameters, it is essential to analyse different organs and tissues at the end of the experiment. For the experiments described here, several tissues will be analysed such as the primary and secondary lymph-nodes and intestines. Samples will be analysed using multiple assays (immunohistochemistry, FACS, ELISA, etc).

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

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academisch Medisch Centrum

Meibergdreef 31
1105 AZ 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
AVD118002017842
Bijlagen
1

Datum 12 april 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 17 maart 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in " met aanvraagnummer AVD118002017842. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 4 april 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft de vraag van de CCD met betrekking tot het ongerief van de dieren in het acute experiment beantwoord en de keuze om dieren van slechts één geslacht in te zetten nader onderbouwd.

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 10a1, lid 2, zijn er algemene voorwaarden gesteld. De voorwaarde over het afstemmen met de IvD om wel dan niet ratten van beide geslachten in het chronische experiment in te zetten is met het oog op het verminderen van dieren in voorraad gedood gesteld.

U kunt met uw project "Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in " starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 juni 2017 tot en met 31 mei 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.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 17 maart 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

In aanvulling op het DEC-advies stelt de CCD voorwaarden. De voorwaarden staan in de vergunning beschreven. Voor het overige nemen wij het advies van de DEC over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

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

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

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

Meer informatie

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

Datum:
12 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017842

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:

Datum:
12 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017842


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: Academisch Medisch Centrum
Adres: Meibergdreef 31
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM
Deelnemersnummer: 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 juni 2017 tot en met 31 mei 2022, voor het project "Modulating sympathetic and parasympathetic innervation of intestine in colitis models in " met aanvraagnummer AVD118002017842, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC AMC. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies. Er worden aanvullende voorwaarde(n) gesteld. Zie voorwaarde.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Principal Investigator/Onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 17 maart 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 17 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 17 maart 2017, ontvangen op 17 maart 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 4 april 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Intervening in neuronal signaling to lymphoid organs in models for inflammatory bowel disease (colitis)				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	1.850	35% Matig 65% Licht	
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	2.770	15% Matig 85% Licht	

Voorwaarden

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

Aanvraagnummer:

AVD118002017842

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.

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat de beslissing om wel dan niet ratten van beide geslachten in het chronische experiment in te zetten met de IvD wordt afgestemd.



Aanvraagnummer:

AVD118002017842

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:

AVD118002017842

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 W17-09									
nr.	document	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2017844								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x		x	x	
5	Appendix			x					
6	DEC-advies				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x		



16 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? <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 11800 <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	Academic Medical Center Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	3 4 3 3 6 2 7 7 7
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	Meibergdreef 31
		Postbus	
		Postcode en plaats	1105AZ Amsterdam
		IBAN	NL68RABO0136166741
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC
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	Principal Investigator/Onderzoeker
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Promovenda / basisarts
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 _ 0 4 _ 2 0 1 7 |
| Einddatum | 0 1 _ 0 4 _ 2 0 2 1 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- | |
|--|
| In-situ tissue engineering of cardiovascular constructs. |
|--|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|--|
| In-situ weefsel formatie voor hart- en vaatprotheses |
|--|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-----------------|
| Naam DEC | DEC AMC |
| Postadres | Meibergdreef 31 |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035.00 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
-

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	Amsterdam
Datum	10 - 02 - 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

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 animal health 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

The three major topics of cardiovascular disease (CVD) are heart valve disease, vascular disease and congenital heart disease. Each of them is subject to specific limitations in surgical treatment with current available substitutes. In this project we focus on an innovative surgical therapy for vascular disease. However, the obtained results can provide contribution to whole field.

Cardiovascular disease represents a major global health burden [1] There are increasing numbers of elderly patients with degenerative cardiovascular disease and there is a growing population of patients with grown up congenital heart (GUCH) disease. Treatments of CVD range from dietary and lifestyle modifications to pharmaceutical and surgical interventions.

A substantial amount of CVD is related to atherosclerosis. Once narrowing of an artery reaches the point where peripheral tissue

becomes ischemic, the most common form of treatment consists of either bypass grafting or endovascular angioplasty. Every year approximately 750,000 coronary artery bypass graft procedures are performed in Europe and the United States of America combined. [1] The number of surgical procedures performed for the treatment of atherosclerosis of small and large caliber peripheral vessels is estimated to be even higher.

Although autologous vascular tissue is the preferred tissue for the treatment of atherosclerotic vascular disease, many patients in need of such surgery are found ineligible due to the quality of their native vessels, because of diffuse atherosclerotic disease, or because of the use of these vessels in previous surgery. Furthermore, the removal of vasculature from its anatomical position is undesirable, especially in patients with atherosclerotic cardiovascular disease. Thus, there is a critical need for suitable small diameter vascular prostheses for the replacement of small caliber blood vessels, such as coronary arteries and lower-limb peripheral vessels.

Previous attempts to create a blood vessel substitute have focused on the use of prosthetic grafts created from synthetic materials, such as expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) or PTFE. These are proven to show potential in the replacement of large caliber vessels (>6 mm diameter) [2]. Consequently high blood flow and low resistance minimalizes the risk of graft thrombosis. However, vessel diameters in the coronary system are much smaller (approximately 1 to 3 millimeter) and therefore more prone to thrombotic events closing off the grafts. With reported patency rates of 40% at 6 months and 25% at 3 years, patency of these small-caliber synthetic grafts. Therefore insufficient and not suitable for clinical use [3, 4].

The ideal vascular graft has the same properties as healthy native tissue. However, the current available prosthetic cardiovascular substitutes are non-viable structures and, therefore, do not have the ability to grow, repair or adjust to functional demand changes. In patients with congenital heart or vascular disease who have survived into adulthood, a prosthetic-patient mismatch will develop by growth of the patient and may lead to multiple surgical re-interventions during life.[5]

Living, tissue engineered substitutes may overcome the mentioned limitations [6]. Within this field of regenerative medicine, cardiovascular substitutes can be created of viable tissue of patients' own cells. With the potential to grow, repair and adapt on environmental changes.

The classical tissue-engineering paradigm involves harvesting of autologous cells, cell expansion, cell seeding onto a biodegradable implants (called scaffold) and bioreactor culture prior to implantation. Also called as the *in-vitro* approach. However, this remains a time consuming and relatively expensive process.

Within an *in-vivo (in-situ)* tissue engineering approach, harvesting of autologous cells, cell expansion and tissue growth onto a biodegradable scaffold will take place in the (patients) body. Here, the main principle is to create a temporary scaffold through which *in-vivo* tissue ingrowth can replace the scaffold, leaving a complete biological vascular conduit in time [7, 8]. With this method the risk of contamination and costs at the expensive *in-vitro* preparation period are reduced. Moreover, no cell-harvesting intervention is needed for the patient; the scaffold is available *of-the-shelf*.

Biological and synthetic based scaffolds are designed to replace the diseased (e.g. stenotic vessels) tissue. There they function as a tissue-forming device. Optional, they can facilitate the delivery of cells or drugs and provides structural support to the cells and forms an environmental niche that determines cell fate. However, recently it is suggested that, even without pre-seeding with cells or drugs, mature tissue may be obtained via an inflammation-mediated process [9, 10]. Therefore, bare, non-seeded scaffolds have potential for as tissue engineered construct and are widely subject of investigation.

Biological scaffolds consist of biopolymers such as collagen, fibronectin or chitosan, or decellularized vascular constructs. These scaffolds provide the proper biological environment and matrix organization, but often lack the appropriate mechanical properties.[11, 12] Moreover are these are non-degradable and show batch-to-batch differences. Importantly, cross-linking strategies to improve mechanical performance often require cytotoxic conditions limiting a viable interaction with cells in these grafts, and therefore their widespread use in the clinic.

Synthetic scaffolds are made of single or multi polymer blends (e.g. poly-ε-caprolactone (PCL) or Polylactide (PLA)) They have the advantage that microstructure, strength, and speed of the fibre degradation can be tuned during production. Moreover, The scientific field get more and more insight in the effect on cell behaviour by environmental cues, [13-16] like the material (fibre dimensions, surface, porosity, degradation velocity) [17] and design (e.g. multi-layered) [18]. They play a crucial roll in cell differentiation and consequently tissue formation and his characteristics. With a better understanding of the interaction between cells and scaffold architecture we can work towards a safe and even patient-specific desired scaffold.

Safe clinical use requires a delicate balance between scaffold degradation and tissue formation, without loss of strength or patency. Scaffold resorption should be mainly cell driven, meaning that the scaffold only degrade, and thus lose strength and durability, when sufficient extracellular matrix has been synthesized by the cells to take over mechanical functionality.

PREVIOUS WORK.

The present study is part of the [REDACTED] research project: [REDACTED]. Within the [REDACTED] Consortium we are testing various synthetic scaffold materials for in vivo research of cardiovascular prostheses (e.g. scaffolds for in situ tissue engineering of small diameter vessels and heart valve prostheses).

During the past years, we developed a library of biodegradable synthetic materials (e.g. [REDACTED]) that can be functionalized with and without bioactive additives [20, 21]. After *in-vitro* experiment the most promising materials were tested *in-vivo* (small and large animals)

There, [REDACTED] material demonstrated sustained functionality up to 12 months, while the implant was gradually replaced by a layered collagen and elastic matrix in pace with cell-driven polymer resorption [22]. However, degradation of the polymer was not complete after 12 months. This is important, as we know largely from orthopedic implants that small debris particles can activate macrophages, and lead to an immune response later in the life of an implant [23, 24]. These effects may also play a role in a cardiovascular setting, making full degradation of the implant an important feature, as remaining polymeric material could potentially initiate a secondary immune response originating from the remaining scaffold. Moreover, in developing constructs for children with congenital heart disease, the capacity to growth and remodel is essential. The formation of polymer-free neo-tissue, in time, can be crucial.

However, the results were in sharp contrast to our *in vivo* rat-studies of a comparable [REDACTED] which degrades rapidly (approx. 1-2 month) which was not enough for tissue formation. However, the neo-vessel showed aneurysmal dilatation and loss of strength (publication in progress).

Therefore we developed two polymers with intermediate degradation kinetics. These showed *in-vitro* intermediate degradation velocity, compared to the mentioned materials above. In this proposal we focus on the aspect of degradation and the effect on matrix formation at the (neo) vascular wall of these two materials.

3.2 Purpose

The objective of the present study is to assess the influence of varying the degradation velocity of a scaffold material on tissue formation and strength.

The following research questions will be addressed:

1. If we vary the scaffold degradation property, does it influence the architecture of tissue formation?
2. What is the influence of scaffold kinetics on the strength of the tissue that is formed?

3.3 Relevance

SCIENTIFIC RELEVANCE.

The results of the proposed studies will contribute basic scientific knowledge in the field of *in-situ* tissue engineering with synthetic bare scaffolds. Outcomes of the study contain insight in the influences of scaffold degradation on tissue formation. Results will help in developing tailored made scaffold material for site-specific conditions thereafter.

PUBLIC RELEVANCE.

Cardiovascular diseases are the leading cause of death worldwide and affect millions of people. In Europe, 4 million deaths are related to cardiovascular diseases. With the increasing numbers of elderly patients the amount of patients in need of surgical treatment for cardiovascular disease will raise. As mentioned above, current available cardiovascular substitutes have major drawbacks.

Additionally, in 2012 the Dutch government has started the discussion about the affordability of health care and the need for drastic measures to contain costs. One of the proposed ways to reduce costs is to increase the efficiency of care. Given the high costs associated with cardiovascular surgery procedure, there is an urgent need to explore the individual patient risks and benefits but also costs for society of currently available treatment strategies for patients with severe CVD and at the same time explore the requirements of innovations that aim to improve current treatment, such as tissue engineered vascular substitutes. Moreover, current cardiovascular related surgical interventions are widely available in the developed world, but they are less suitable for patients in the developing world due to their age profile and socio-economic circumstances [25, 26].

3.4 Research strategy

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

After in vitro assessments (e.g. cytotoxic and degradation assessments, blood culturing, fatigue resistance tests), questions regarding the developed scaffolds degradation characteristics will be answered in small animals (this proposal) Therefore two new synthetic scaffold materials will be tested and one control material. Our research model for in vivo research of cardiovascular prostheses resembles the human situation [27, 28]. It enables us to study circulating cells as predominant pathway of cellularization, neo-tissue formation and scaffold degradation in a long-term follow-up experiment.

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 present proposal involves only one single experiment. We will use an established rat model: the abdominal aortic interposition graft model. Our group has a lot of experience with this model [redacted] and has modified it in such a way that transanastomotic cell ingrowth does not take place (grafts will be shielded by a layer of Gore-Tex)[27, 28].

After implantation of a vascular graft, transanastomotic and transmural ingrowth of endothelial- and smooth muscle cells appears to be the main source of tissue forming cells in (small) animal models. In the human situation however, transanastomotic neo-tissue formation is typically restricted to the immediate peri-anastomotic region, which makes transanastomotic endothelialization clinically less relevant. We developed a rat model based on the traditional abdominal aortic interposition graft.

However, the protocol provides a more relevant platform to study the regeneration process in a preclinical setting as we block the transanastomotic and the transmural migration of cells into the graft using a Gore-Tex sheet, which serves as a barrier for cellular infiltration from adjacent tissues. This enables us to study circulating cells as the predominant pathway of cellularization and neo-tissue formation, without being obscured by the default rodent-specific mechanisms of ingrowth from adjacent tissues.

Within this proposal, small vascular grafts made of polymers with *different degradation properties* will be implanted. At several time points after surgery, animals will be sacrificed and histopathological examination will be performed as well as tests to assess the presence of scaffold material. Maximum follow up time is 10 months. (See appendix Figure 1-2).

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.

As stated above this experiment is a single experiment were three different grafts with *different degradation profiles* of the scaffolds will be compared in long-term follow-up.

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	Abdominal Aorta interposition grafts replacement in rats

REFERENCES

1. Roger, V.L., et al., *Executive summary: heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association*. Circulation, 2012. **125**(1): p. 188-97.
2. Xue, L. and H.P. Greisler, *Biomaterials in the development and future of vascular grafts*. J Vasc Surg, 2003. **37**(2): p. 472-80.
3. Chlupac, J., E. Filova, and L. Bacakova, *Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery*. Physiol Res, 2009. **58 Suppl 2**: p. S119-39.
4. Thottappillil, N. and P.D. Nair, *Scaffolds in vascular regeneration: current status*. Vasc Health Risk Manag, 2015. **11**: p. 79-91.
5. Schultz, A.H. and G. Wernovsky, *Late outcomes in patients with surgically treated congenital heart disease*. Semin Thorac Cardiovasc Surg Pediatr Card Surg Annu, 2005: p. 145-56.
6. Yacoub, M.H. and J.J. Takkenberg, *Will heart valve tissue engineering change the world?* Nat Clin Pract Cardiovasc Med, 2005. **2**(2): p. 60-1.

7. Bergmeister, H., et al., *Biodegradable, thermoplastic polyurethane grafts for small diameter vascular replacements*. Acta Biomater, 2015. **11**: p. 104-13.

8. Xu, X.F., et al., *A novel surgical procedure: scaffold-pulmonary autograft transplantation*. International journal of clinical and experimental medicine, 2013. **6**(8): p. 662-6.

9. Roh, J.D., et al., *Tissue-engineered vascular grafts transform into mature blood vessels via an inflammation-mediated process of vascular remodeling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(10): p. 4669-74.

10. Franz, S., et al., *Immune responses to implants - a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials*. Biomaterials, 2011. **32**(28): p. 6692-709.

11. Li, M., et al., *Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering*. Biomaterials, 2005. **26**(30): p. 5999-6008.

12. Buttafoco, L., et al., *Physical characterization of vascular grafts cultured in a bioreactor*. Biomaterials, 2006. **27**(11): p. 2380-9.

█

█

█

15. Ciobanasu, C., B. Faivre, and C. Le Clainche, *Integrating actin dynamics, mechanotransduction and integrin activation: the multiple functions of actin binding proteins in focal adhesions*. Eur J Cell Biol, 2013. **92**(10-11): p. 339-48.

16. Geiger, B., J.P. Spatz, and A.D. Bershadsky, *Environmental sensing through focal adhesions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(1): p. 21-33.

█

█

█

18. Tamiello, C., et al., *Heading in the Right Direction: Understanding Cellular Orientation Responses to Complex Biophysical Environments*. Cell Mol Bioeng, 2016. **9**: p. 12-37.

█

█

█

█

█

█

23. Nich, C., et al., *Macrophages-Key cells in the response to wear debris from joint replacements*. J Biomed Mater Res A, 2013. **101**(10): p. 3033-45.

24. Hallab, N.J., *Biologic Responses to Orthopedic Implants: Innate and Adaptive Immune Responses to Implant Debris*. Spine (Phila Pa 1976), 2016. **41 Suppl 7**: p. S30-1.

25. Zilla, P., et al., *Prosthetic heart valves: catering for the few*. Biomaterials, 2008. **29**(4): p. 385-406.

26. al., A.T.F.M.e., *Guidelines on the management of valvular heart disease (version 2012): The Joint Task Force on the Management of Valvular Heart Disease of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS)*. Eur Heart J, 2012.

█

█

█

█



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'.	11800	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Academic medical center Amsterdam	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Abdominal vascular interposition graft replacement in rats

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

Synthetic biodegradable vascular grafts¹ will be implanted in the abdominal position in rats to induce vascular tissue formation *in-vivo* (*in-situ* tissue engineering) by circulating cells only. We will use 3 different vascular grafts (scaffold-1, scaffold-2, scaffold-3) that are made of materials that differ regarding their degradation velocity. The graft is wrapped with Gore-Tex to prevent transmural and transanastomotic ingrowth of cells. Consequently only circulating cells (and not transanastomotic ingrowth) contribute to tissue formation².

Outcome parameters are the architecture and strength of tissue formation. This will be assessed by histological examination and strength tests (performed in [redacted]). This will be related to the degradation (and thus presence) of scaffold material (tests performed in [redacted]). Before sacrifice the animals will undergo MRI with contrast to determine patency of the graft.

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

ANIMAL PROCEDURE

All rats will receive an interposition vascular graft implantation replacing part of the abdominal aorta. The animals are deeply anesthetized. The segment of the abdominal aorta between the renal arteries and the aortic bifurcation will be replaced. After transection of the aorta a 15 mm length interposition graft will be implanted using interrupted sutures. The grafts are shielded with Gore-Tex, as described and validated by our colleague.² (See addendum- figure 2)

On the day of explantation, animals will be fully anaesthetized. A MRI scan will be conducted. Thereafter we will sacrifice the animals to collect the vascular scaffold, the heart, liver, brain and lungs for analysis. (Thromboembolic and inflammatory control).

FOLLOW-UP

The animals will be terminated at five time points, the vascular grafts will be explanted and analysed (see table 1 and addendum fig.1). The chosen time points are based on the degradation profile and immune response. Foreign body implantation induces an immune response. This is the main driven factor for cell attraction in neo-tissue formation of the blood vessel. The first time point (7 days) enables us to study this acute inflammatory response in the implants by histology. (e.g. macrophages, monocytes, neutrophils infiltration.). Thereafter at 6 weeks and 3 months we can analyse the start of degradation and remodelling phase and endothelialisation.² For analysis of the vascular strength of the three different grafts the later time points are crucial.

Follow-up Experimental group	7 Days	6 weeks	3 months	6 months	10 months	(n)
Scaffold-1 (n)	4	4	4	4	4	20
Scaffold-2 (n)	4	4	4	4	4	20
Scaffold-3 (n)	4	4	4	4	4	20
Drop-off (n)	3	3	3	3	6	18
Training (n)	-	-	-	-	-	4
Total (n)	15	15	15	15	18	82

Table 1: sample size

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

Previously, our own investigator group performed an *in-vitro* experiment with the three scaffolds as mentioned before, showing differences in the degradation properties of biodegradable materials. This *in-vitro* experiment focused on a single degradation pathway, comprising both the hydrolytic and oxidative pathways. However, for the proposed *in-vivo* experiment it is of importance to assess either the enzyme-accelerated hydrolytic and the oxidative degradation pathways, since both pathways may individually affect the implanted scaffold. Hence, our *in-vitro* results cannot be used in the sample size calculation our estimation of an effect size for clinical supposes. To estimate the number of animals, we will base the sample size calculation on former results in current literature²⁻⁴. Groups of 4 animals per time point were significant to show differences of immuuncel influx, tissue formation (endothelialization, collagen formation e.g.) in comparable materials ($p < 0.005$)

In addition, they experienced 15-20% failure due to operative complication or loss of material post-mortem (e.g. difficulties of cutting GoreTex wrapped grafts). Moreover, at the later follow-up time animals reach age of 12 months old. We expect more drop-off of animals at older age. Therefor 3 extra animals are needed at older age. For training of the procedure 4 animals are requested. Training of the procedure will be performed previously on the experiment under supervision of experience researchers. First starting with rat the so-called 'plastinates' (dry specimens,) Thereafter on, if vailable, surplus animals.

B. The animals

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

SPECIES: Rat

The dimensions of the rat abdominal aorta (2-4 mm diameter) are comparable with the dimensions of the human coronary artery. In the model we can acquire proper amount of explant material length and diameter in the rat.

Surgical replacement of the GoreTex wrapped interposition graft is not possible in smaller animals.

ORIGIN: Outbred- Sprague Dawley Rats

In this study an outbred strain Sprague-Dawley rats will be used. Previous related experiments of our group are conducted with the same species.^{1,5} Moreover, the Sprague-Dawley rat is well accepted by the scientific community for cardiovascular research in the field of tissue engineering. Findings of this study can be translated towards previous rat-studies of tissue engineered vascular prostheses.

GENDER: Male

We will use male rats only. The abdominal aorta of Sprague Dawley male rats is comparable with the available size of the vascular grafts (1,8mm – 2,0 mm diameter). Matching the size of native vessel and scaffold implant is important for bloodflow and shear stress at the trananastomotic region.

However we are aware of the influence of gender on heart disease in humans, this is unknown in rats. With male rats, we avoid the risk of hormonal influence on cell recruitment. Moreover, this is not in the scope of our research.

LIFE STAGES:

8-10 weeks old rats will be used, where plateauing of growth curve is started⁶

ESTIMATED NUMBERS:

A number of 82 animals is requested (See table 1) Four extra animals are requested for training, which can be surplus animals. Cause the animals will be in the study for (maximum) of 10 months, part of the animals will be old at the end of the study. We expect to have more drop-off in the long-term follow-up groups. Therefore 3 extra animals are requested on the latest follow-up point.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

Prior to *in-vivo* experiments our partner university in Eindhoven has performed a set of *in-vitro* experiment. This includes hemodynamic stretch tests, *in-silico* modelling, mesofluid-based tests and migration assays of the scaffold material and tissue formation. Moreover, to mimic natural environment, *in-vitro* experiments were conducted in bioreactors. Bioreactor systems provide both the technological means to reveal fundamental mechanisms of cell function in a 3D environment, and the potential to improve the quality of engineered tissues by enabling reproducible and controlled changes of specific environmental factors. A variety of bioreactors at our partner university allow us to study cell and tissue responses prior to *in-vivo* experiments. This will select the desired scaffolds prior to *in-vivo* experiments. Some research question can already be answered with these experiments.

However, hemodynamic variance, metabolism and environmental cues are complex and not yet mimicked in the lab. Most importantly, assessing what tissue will be produced during long follow up times is not possible in an *in vitro* setting. To determine similarity with humans pre-clinical animal studies have to be performed.

Reduction

The rat model subscribed in this proposal has been conducted and validated by our research group, previously. The experience from these experiments will contribute to a minimisation of peri- and post-procedural complications

Moreover, the control material (vascular graft; Scaffold type-1) was tested in these experiments. *In-vitro*, scaffold type-1, scaffold type-2 and scaffold type-3 showed no other differences than their degradation kinetics. In respect with our experience with the material we do not expect major complications with respect to biocompatibility, hemodynamic strength and cell infiltration with these.

Complications, other as experienced are therefore reduced, therefore less animals are needed.

Previously on the experiments we will, to train surgical skills on plastinates (dry specimens,) rat.

More-over for training suppose surplus animals can be used, which will reduce the amount of animals in general.

Refinement

Surgical procedures will be conducted under general anaesthesia. After the procedure all rats receive analgesics to reduce pain and stress. The animals will be kept in groups in accordance to European regulations.

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

The rats will receive pre- peri and postoperative analgesic treatment for 24 -36 hour.

Pre-operative they will receive opioids (Temgesic sc) and local anesthetic (Lidocaine and bupivacaine)
During the operation general anesthesia is induced with isoflurane gas.
Post-operative animals receive painkillers for 24-36 hours (Opioids)

Furthermore, the animals will be kept in groups, have natural environmental enrichment. This will decrease stress.

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.

Operative procedures:

Pre-operative opioids (Temgesic sc) and local anesthetic (Lidocaine and bupivacaine)

During the operation general anesthesia is induced with isoflurane gas.

Post-operative animals receive painkillers for 24-36 hours (Opioids)

The procedure will be performed by educated and certificated staff and researchers in (microsurgical) procedures.

The procedures will be supported by biotechnicians of the animal laboratory.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Stress, anorexic, inactivity

Explain why these effects may emerge.

Waking up of the surgical procedure induces stress (anxiety)

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

The first hours after the operation, the animals will recover in solitary housing. As soon as possible they will return to the group. This will be indicated, as the rat is active again and can eat independent. (expected within 2-4 hours)

The animal will receive high energetic food and recovery gel. Also the forage can be solved in water for easy digestion.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

The following circumstances could arise and should be used to identify the human endpoints.

- 1) Significant amount of weight loss (5% initial weight) and no proper eating behaviour
- 2) withdrawn behaviour
 - inactivity
 - tremor
 - convulsions, as a result of trombotic cerebral events.
 - self-mutilation
- 3) Lesion or infection of the operation wound, (purulent discharge, pus, absces, fever)
- 4) Paralysis of hind legs, caused by trombotic events (decreased patency of the graft)
- 5) Cerebral complications caused by tromboembolic events
- 6) Serious bleeding (squirted wound or significant hematoma)

Indicate the likely incidence.

Specific experimental expected circumstances

Previous comparable experiment of our group showed an average of 5-10% complications related to the (surgical) intervention.

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').

Induction of anaesthesia – **mild** discomfort caused by stress
Recovery of the graft implantation – **moderate** discomfort for 4 hours.
Post operative +1 a 1,5 days - **mild** discomfort for 24-36 hours.

Total expected level of discomfort: **moderate**

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Vascular grafts have to be explanted for histological and immunological analysis

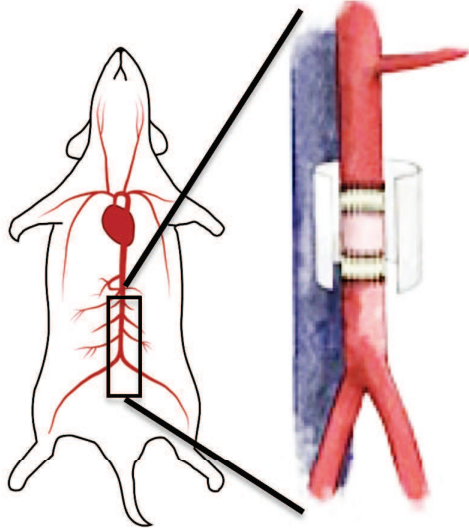
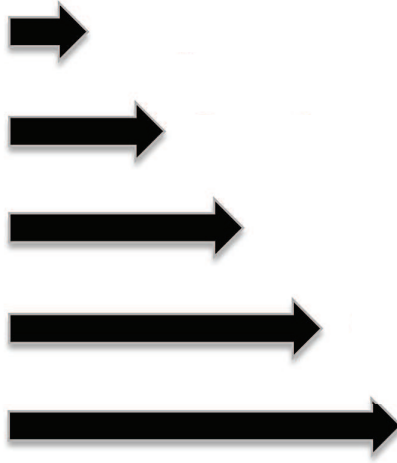
Is the proposed method of killing listed in Annex IV of Directive 2010/63/EU?

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

Yes



5. Rocco KA, Maxfield MW, Best CA, Dean EW and Breuer CK. In vivo applications of electrospun tissue-engineered vascular grafts: a review. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20:628-40.
6. Envigo - Laboratory animals

Implantation**Follow-up****Explantation**

7 days

6 weeks

3 months

6 months

10 months

Group 1, 2 or 3 -

*Implantation of vascular scaffold type
1,2 or 3 resp.*

Analyses of the explant

*Scaffold cell colonisation
Vascular matrix organisation
Scaffold degradation*

Figure 1: **Illustration of the study design**

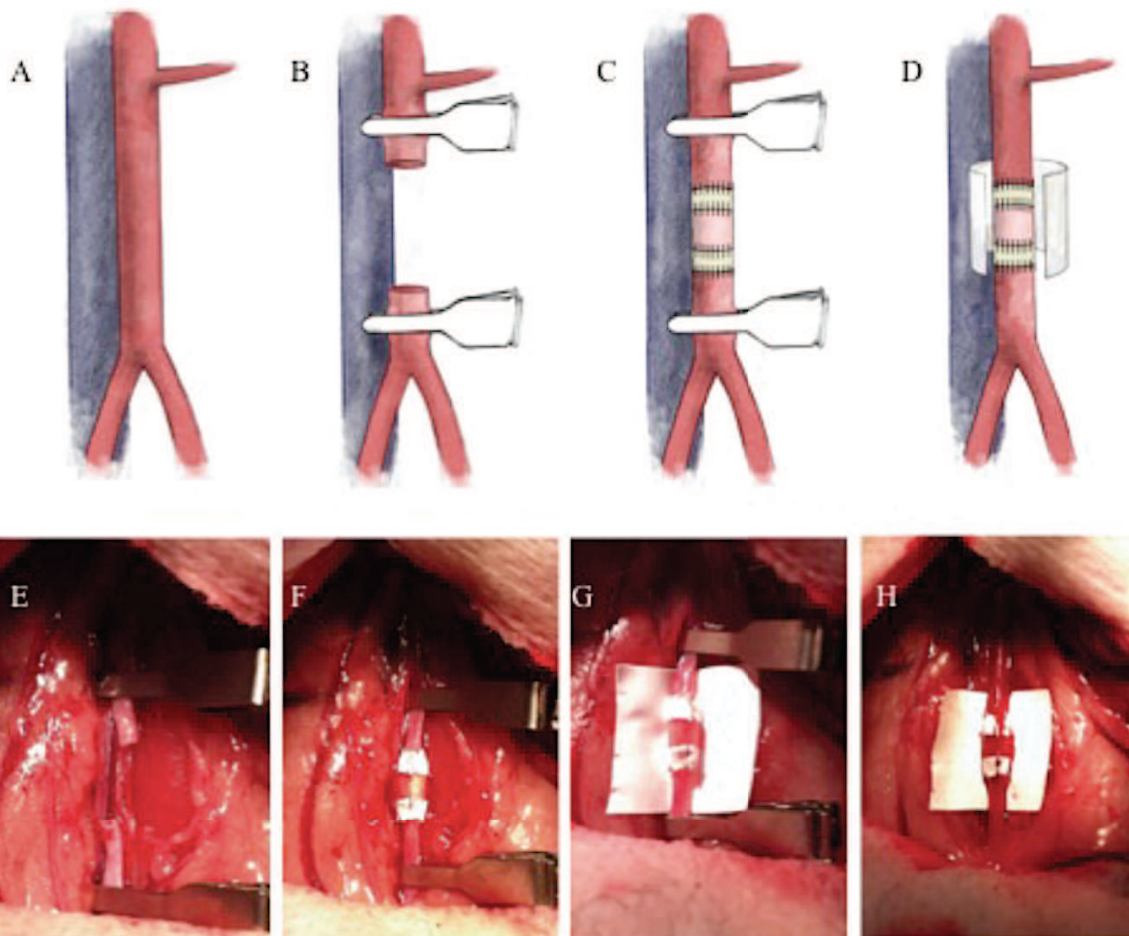


Figure 2: **Illustration and macroscopic images of graft implantation** - Illustration of the aorta before (A), after resection (B), after implantation of the graft (C) and directly after removing the vascular clamp (D). Images after resection (E), after implantation (F), addition of the Gore-Tex sheet (G) and after removal of the vascular clamps (H)



24 mei 2016

Format DEC-advies

Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de Praktische Handreiking: Ethisch Toetsingskader voor proefdiergebruik. Voor voorbeelden, zie bijlage I.

A. Algemene gegevens over de procedure

Bij de punten 1 t/m 7 dienen altijd de gevraagde gegevens te worden ingevuld.

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project In-situ tissue engineering of cardiovascular implants
3. Titel van de NTS Gekweekte lichaamseigen bloedvaten vervangen zieke bloedvaten
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC DEC-AMC
 - telefoonnummer contactpersoon 
 - e-mailadres contactpersoon 
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken 26-01-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD
7. Afstemming IvD

De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.
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 n.v.t.
 - Datum
 - Gestelde vraag/vragen
 - Datum antwoord

- Verstrek(e) antwoord(en)
- De antwoorden hebben ~~wel~~niet 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)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.

>Ja

Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.

2. De aanvraag betreft > een nieuwe aanvraag.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?

> Ja

4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.

> Nee

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 (het verkrijgen van inzicht in het effect van de afbraaksnelheid van drie verschillende typen kunststof bloedvaten in de vorming en sterkte van nieuw weefsel). De volgende vragen zullen beantwoord worden:
I) Hangt de opbouw van het nieuwe weefsel af van de afbraaksnelheid van de kunststof bloedvaten?;

II) Wat is de invloed van de afbraaksnelheid van de kunststof bloedvaten op de sterkte van het nieuw gevormde weefsel?

Deze twee vragen zullen in één experiment onderzocht worden.

Het project lijkt haalbaar, afgaande op het voorwerk en de ervaring van deze onderzoekers, de omvang en de aangegeven tijdsspanne.

Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan in de dierproef die nodig is om de subdoelen te bereiken.

Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.

- > Niet, voor zover kan worden opgemaakt uit de aanvraag.
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 aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek gedaan naar de invloed van de afbraaksnelheid van kunststof bloedvaten op de weefselvorming in het bloedvat. Deze resultaten dragen bij aan de ontwikkeling van beter geschikte kunststof bloedvaten in de behandeling van artherosclerose. Dit maakt het onderzoek zowel fundamenteel als translationeel.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).
- > Het directe doel van het project is het verkrijgen van inzicht in het effect van de afbraaksnelheid van drie typen kunststof bloedvaten in de vorming en sterkte van nieuw weefsel. Het uiteindelijke doel van het project is om het meest geschikte, aangepast aan de specifieke plek, materiaal te kunnen kiezen voor de kunststof bloedvaten. Het directe doel vormt een logisch en onmisbaar deel van de route naar het uiteindelijke doel en heeft daardoor een reële relatie.
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 en translationele project dat gericht is op het verkrijgen van meer inzicht in de rol van de afbraaksnelheid van kunststof bloedvaten, zijn de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten die aderverkalking ontwikkelen.
- Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress en pijn ondervinden. Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: zij zullen kennis verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en mogelijk patenten.
- Waarden die voor patiënten met verkalkte slagaders bevorderd worden: het ontwikkelen van kunststof bloedvaten die gebruikt kunnen bij o.a. bypass operaties, als er geen gezonde bloedvaten van de patiënt zelf gebruikt kunnen worden.
6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wetgeving.
- > Er is geen sprake van substantiële milieueffecten, voorzover de DEC dit kan overzien.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw antwoord toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

> De IvD ziet erop toe dat alle personen die bij dit onderzoek betrokken zullen zijn, zowel de analisten en onderzoekers die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van deskundigheid en kennis.

De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met onderzoek naar cardiovasculaire regeneratieve weefselontwikkeling. Wij achten de kennis en kunde van de onderzoeksgroep voldoende gewaarborgd.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw antwoord toe. *Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

> De opzet van het experiment is logisch en goed te begrijpen. De aangegeven doelstellingen kunnen met deze experimentele aanpak behaald worden.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wod voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- 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)

> Er is geen sprake van bijzondere dieren, omstandigheden of behandelingen.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan omdat het om wetenschappelijke redenen noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht toe waarom wel/niet.

> Er is voldaan aan bijlage III

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).
 - > Ongeriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongerief

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).
 - > De "heelheid" van het dier wordt niet aangetast zodanig dat sprake is van vermindering of ontneming van soortspecifieke eigenschappen.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
 - > De humane eindpunten zijn helder gedefinieerd (uiterlijke kenmerken/>5%gewichtsverlies ten opzichte van het begingewicht/inactiviteit/trillen/zelfmutilatie/ontsteken van de wond/verlamming achterpoten/bloedingen). De inschatting van het percentage dieren (5-10%) dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is, op basis van ervaring van de onderzoeksgroep, realistisch ingeschat.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
 - > De hemodynamische variatie, metabolisme en stimuli uit de directe omgeving zijn complex en kunnen niet worden nagebootst in een *in vitro* model. Vervanging van de aangevraagde dierproeven is hierdoor niet mogelijk, maar voorafgaand aan deze dierproef is gebruik gemaakt van *in vitro* experimenten met de kunststof bloedvaten om verschillende eigenschappen te onderzoeken.

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
 - > De aantallen dieren zijn ingeschat op basis van groepsgroottes uit eerdere gepubliceerde studies waarin 4 dieren per groep voldoende waren om een verschil aan te tonen in immuun-cel-influx en weefselvorming. Er vond in die studies een uitval plaats van 15-20 %; op basis hiervan wordt er per tijdstip één dier per kunststof bloedvat extra meegenomen. Ook wordt er meer uitval verwacht als de ratten 12 maanden oud zijn. Er worden voor die groep 2 extra dieren per kunststof bloedvat meegenomen. Er wordt een realistische schatting gemaakt voor het aantal dieren dat nodig is om een statistisch significant verschil te behalen.

16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd? Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
 - > In dit project wordt anesthesie toegepast en wordt er pijnstilling gebruikt om pijn en stress te voorkomen. De ratten krijgen geweekt, hoogcalorisch voedsel en een gel die op de bedding geplaatst wordt ten behoeve van sneller herstel na de operatie. De humane eindpunten zijn duidelijk geformuleerd, waarmee de mate van verfijning verder is geborgd.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).
> Alleen mannelijke ratten worden gebruikt. Dit heeft een technische reden. Het is erg belangrijk dat het kunststof bloedvat goed aansluit op het bestaande bloedvat. De aorta's van de mannetjes hebben dezelfde grootte als de kunststof bloedvaten, waarmee deze aansluiting dus beter is dan in vrouwelijke dieren.
19. Geef aan of dieren gedood worden in kader van het project (tijdens of na afloop van de dierproef). Indien dieren gedood worden, geef aan of en waarom dit noodzakelijk is voor het behalen van de doelstellingen van het project. Indien dieren gedood worden, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van de richtlijn. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht dit toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
> De dieren worden in het kader van de proef gedood volgens een methode van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Doden is noodzakelijk omdat in het kader van het experiment de weefsels uit het dier moeten worden gehaald voor analyse.
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

20. Is de niet-technische samenvatting een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd?
> Ja, deze is in overleg met de afdeling communicatie van de vergunninghouder bewerkt met het oog op de begrijpelijkheid.

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigt het verkrijgen van meer inzicht in de rol die de afbraaksnelheid van een kunststof bloedvat speelt in de sterkte en de opbouw van nieuw bloedvatweefsel, het matige ongerief dat de ratten als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?

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*).

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op ***het verkrijgen van meer inzicht in de rol die de afbraaksnelheid van een kunststof bloedvat speelt in de sterkte en de opbouw van nieuw bloedvatweefsel***, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit de patiënten die lijden aan aderverkalking en een bypassoperatie nodig hebben.

De ratten worden door dit onderzoek geschaad omdat het pijn en stress veroorzaakt. Er worden 82 ratten gebruikt in dit onderzoek.

De andere groep direct belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijk veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat meewerken aan dit onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij nieuwe vindingen mogelijk kunnen patenteren.

Minder direct aanwezig zijn de waarden en belangen van patiënten. De inzichten die dit onderzoek zal opleveren, kunnen op termijn een belangrijke bijdrage leveren aan de ontwikkeling van kunststof bloedvaten die gebruikt kunnen worden in bypass operaties. Dit valt echter buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Hoewel 82 ratten matig ongerief zullen ondergaan, acht de DEC dit gerechtvaardigd vanwege de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. Het plaatsen van deze kunststof bloedvaten zal matig ongerief veroorzaken in de ratten, maar de DEC erkent dat dit model nodig is om de vraagstelling te beantwoorden. Het maatschappelijke belang van deze projectaanvraag is dat er meer inzicht komt in de rol die de afbraaksnelheid van kunststof bloedvaten kan spelen in de uiteindelijke sterkte en opbouw van het nieuwe bloedvatweefsel. Dit onderzoek kan leiden tot de beste selectie van kunststof bloedvaten aangepast aan de situatie waarin ze geplaatst zullen worden. De toepassing van dit inzicht in de therapeutische behandeling zal nog jaren duren en ligt buiten dit voorstel. De resultaten van deze studie zullen bijdragen aan de wetenschappelijke kennis in het veld van in situ afbreekbare kunststof bloedvaten.

De DEC waardeert de vermeerdering van fundamentele kennis en de toepassing daarvan op korte termijn als het meest zwaarwegende gevolg dat tegenover het maximaal matige ongerief van 82 ratten staat. Dat het onderzoek ook nog maatschappelijke gevolgen heeft doordat de inzichten verkregen uit dit onderzoek in de toekomst kunnen worden gebruikt voor de therapeutische behandeling van aderverkalking weegt ook mee, zij het in mindere mate.

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*).

Gekweekte lichaamseigen bloedvaten vervangen zieke bloedvaten

De DEC is van mening dat het belang van het verkrijgen van inzicht in de invloed die de afbraaksnelheid van kunststof bloedvaten kan spelen in de opbouw en de sterkte van nieuw gevormd bloedvatweefsel (het wetenschappelijk belang), en op langere termijn, de bijdrage aan het meest geschikte materiaal voor kunststof bloedvaten om te gebruiken bij onder andere bypassoperaties (het maatschappelijke belang), het matige ongerief dat de 82 ratten in dit onderzoek zullen ervaren, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De kennis en kunde van de onderzoekers is aanwezig. Het wetenschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk en zal de directe opbrengst zijn van dit onderzoek. Het maatschappelijke belang van de doelstelling is dat er meer inzicht komt in het meest geschikte materiaal voor kunststof bloedvaten. De onzekerheid dat deze kennis daadwerkelijk bijdraagt aan een nieuwe therapie, is meegewogen in het advies. Voorafgaande resultaten uit het *in vitro* werk zijn gebruikt om de verschillende kunststof bloedvaten uitgebreid te onderzoeken.

Om de doelstelling te bereiken worden ratten als proefdieren gebruikt. Het matige ongerief dat de ratten ondergaan, wordt veroorzaakt door de operatie. Dit *in vivo* experiment is nodig omdat de complexe samenhang van de verschillende cellen niet *in vitro* nagebootst kan worden. De onderzoekers beperken het ongerief van de dieren door verschillende maatregelen (veel ervaring met de modellen, duidelijk geformuleerde humane eindpunten en aanbod van geweekt, hoogcalorisch voer).

De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven wetenschappelijke doelstellingen en dat de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de kaders van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstelling te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De aanvrager heeft volgens de DEC overtuigend aangegeven dat gebruik van ratten voor het behalen van het directe doel noodzakelijk is en dat er geen geschikte proefdiervrije alternatieven mogelijk zijn.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

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*).

Dit DEC-advies is unaniem tot stand gekomen.

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

Er zijn geen knelpunten of dilemma's naar voren gekomen bij dit projectvoorstel.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academic Medical Center Amsterdam

Meibergdreef 31
1105 AZ 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
AVD118002017844

Bijlagen

2

Datum 14 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 14 februari 2017. Het gaat om uw project "In-situ tissue engineering of cardiovascular constructs". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD118002017844. 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:

14 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD118002017844

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
14 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017844

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11800
Naam instelling of organisatie: Academic Medical Center Amsterdam
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: ██████████
KvK-nummer: 343362777
Straat en huisnummer: Meibergdreef 31
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM
IBAN: NL68RABO0136166741
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: AMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████
Functie: Principal Investigator/Onderzoeker
Afdeling: ██████████
Telefoonnummer: ██████████
E-mailadres: ██████████

Datum:
14 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017844

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 april 2017
Geplande einddatum: 1 april 2021
Titel project: In-situ tissue engineering of cardiovascular constructs
Titel niet-technische samenvatting: In-situ weefsel formatie voor hart- en vaatprotheses
Naam DEC: DEC AMC
Postadres DEC: Meibergdreef 31
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.287,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Amsterdam
Datum: 10 februari 2017

Datum:
14 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017844



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

AMC crediteurenadministratie
Postbus 400
1115 ZJ DUIVENDRECHT


**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
AVD118002017844
Bijlagen
2

Datum 14 februari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 14 februari 2017
Vervaldatum: 16 maart 2017
Factuurnummer: 170844
Ordernummer: Kostenplaatsnummer 

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD118002017844	€ 1.287,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academic Medical Center Amsterdam

[REDACTED]

Meibergdreef 31

1105 AZ 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

AVD118002017844

Bijlagen

1

Datum 3 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 14 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "In-situ tissue engineering of cardiovascular constructs" met aanvraagnummer AVD118002017844. 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 "In-situ tissue engineering of cardiovascular constructs" starten. De vergunning wordt afgegeven van 4 april 2017 tot en met 1 april 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 14 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:
3 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017844

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: Academic Medical Center Amsterdam
Adres: Meibergdreef 31
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM
Deelnemersnummer: 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 4 april 2017 tot en met 1 april 2021, voor het project "In-situ tissue engineering of cardiovascular constructs" met aanvraagnummer AVD118002017844, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC AMC.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Principal Investigator/Onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 14 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 16 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 4 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 14 februari 2017, ontvangen op 17 februari 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
1: Abdominal vascular interposition graft replacement in rats				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) / Sprague-Dawley rats	82	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 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.

Aanvraagnummer:
AVD118002017844

De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarde wijzigen of intrekken.



Aanvraagnummer:

AVD118002017844

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:

AVD118002017844

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 W17-09									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2017845								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	DEC-advies				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Advies CCD		x						x
9	Beschikking en vergunning				x		x		



16 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? <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 11800	
		<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	Academic Medical Center Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	3 4 3 3 6 2 7 7 7
		Straat en huisnummer	Meibergdreef 31
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Postbus	
		Postcode en plaats	1105AZ Amsterdam
		IBAN	NL68RABO0136166741
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Zie bijgesloten procedure voor betaling AMC
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	Associate professor
		Afdeling	Center for Experimental and Molecular Medicine
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 _ 0 1 _ 2 0 1 8 |
| Einddatum | 3 1 _ 1 2 _ 2 0 2 2 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- | |
|---|
| Novel treatment options for pulmonary fibrosis. |
|---|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|---|
| Betere behandel mogelijkheden voor longfibrose. |
|---|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|-----------------|
| Naam DEC | DEC AMC |
| Postadres | Meibergdreef 31 |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1287.00 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
- Appendix 3.4.4.1 en 3.4.4.2

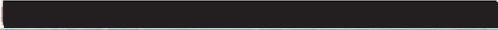
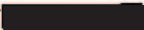

6 Ondertekening

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

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	Amsterdam
Datum	10 - 02 - 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.

Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF), the most common form of pulmonary fibrosis, is a chronic and ultimately fatal disease that is characterized by a progressive decline in lung function. Clinically, the main symptoms of IPF are chronic cough and shortness of breath. Usually the breathlessness first appears

during exercise. Breathlessness can affect day-to-day activities such as showering, climbing stairs, getting dressed and eating. As disease progresses and scarring in the lungs gets worse, breathlessness may prevent all activities and patients die relatively shortly after diagnosis. Indeed, the prognosis of IPF is devastating: there is only a 20-25% survival rate at 3-5 years after diagnosis and its mortality rate exceeds many types of cancer.

Treatment modalities for IPF are limited and lung transplantation is the last resort, which is however for selected patients only. Recently, two novel drugs, i.e. pirfenidone and nintedanib, became clinically available. Both seem to slow the decline of lung function in patients with IPF, while pirfenidone also slightly improves survival of IPF patients. However, both drugs have serious side effects, show no benefit on quality of life, and do not stop nor reverse the disease. Novel treatment options are thus eagerly awaited.

To reduce both morbidity and mortality associated with pulmonary fibrosis, it is pivotal to identify novel mediators involved in disease progression. Targeting such novel mediators during disease progression in pre-clinical animal models is subsequently a first pivotal step to determine whether the novel mediators may have therapeutic potential. Only in case pharmacological inhibition is effective in these pre-clinical models, clinical studies may be designed.

Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is the best described pre-clinical model of human lung fibrosis that has been widely used to study mechanisms involved in fibrogenesis and for the evaluation of potential therapies for IPF. Intratracheal or intranasal delivery of bleomycin into the lung results in direct cell injury through the induction of DNA strand breaks, the generation of free radicals, and the induction of oxidative stress. This results in pulmonary inflammation between day 3 and 7 after bleomycin instillation and subsequent interstitial fibrosis (starting at day 10-12 and peaking at around day 21 after bleomycin instillation; Figure 1).

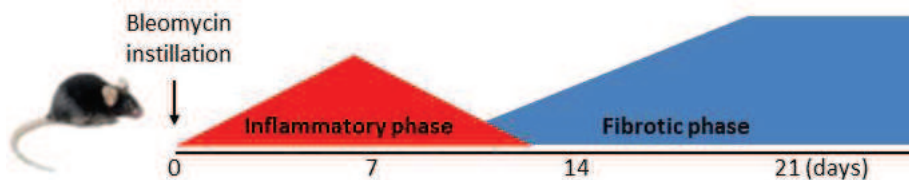


Figure 1: Different processes induced after bleomycin instillation into the lung of mice. Initially bleomycin induces an inflammatory response which is followed by the fibrotic phase.

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?

Based on *in vitro* work, patient biopsies or literature, novel pathways/mediators potentially involved in pulmonary fibrosis will be identified. Importantly however, *in vitro* studies do only partly mimic the complex interplay of cells/processes involved in pulmonary fibrosis *in vivo*. The actual importance of the most promising pathways/mediators identified *in vitro* thus need to be assessed in *in vivo* models. Similarly, patients data showing, for instance, that certain pathways/mediators are highly expressed in pulmonary fibrosis patients as compared to controls do not yet prove that these pathways/mediators are involved in disease progression. Again, the actual importance of these pathways/mediators need to be assessed in *in vivo* models. The primary objective (i.e. "directe doel") of the current project is therefore to prove or refute the importance of potential novel pathways/mediators in pulmonary fibrosis and to assess the underlying mechanism by which these pathways/mediators modify pulmonary fibrosis. Ultimately (i.e. "uiteindelijke doel"), this should result in the identification of novel compounds as candidates for future clinical studies and in a better understanding of the etiology of pulmonary fibrosis.

We expect to successfully achieve the primary objective of the current project as we have ample experience with the bleomycin-induced fibrosis model [REDACTED]

[REDACTED] Next to skill full biotechnicians experienced with the bleomycin model, we also have all necessary assays to analyse inflammation and fibrosis routinely up- and running in our laboratory. Importantly, both pirfenidone and inatinib (the only two approved drugs for the treatment of IPF) limit fibrosis in the bleomycin model suggesting the model is suitable to identify fibrotic mediators relevant for the human setting.

3.3 Belang

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

Pulmonary fibrosis is a devastating disease with no effective treatment options resulting in high morbidity and mortality. Novel treatment options are eagerly awaited for, and research consequently focusses on the identification of novel pathways/mediators that could be targeted to limit the progression of pulmonary fibrosis. *In vitro* experiments and/or *ex vivo* patient data identify potential novel pathways/mediators to target and, in the current project, we propose to determine the *in vivo* fibrotic effect (and underlying mechanism) of these novel pathways/mediators suggested to drive fibrosis.

The identification of novel pathways/mediators involved in disease progression is of great scientific importance as it will significantly increase our knowledge of the etiology of pulmonary fibrosis (which is currently largely unknown). Fully understanding disease etiology is critically important for rationale design of future treatment strategies thereby decreasing pulmonary fibrosis-related morbidity and mortality.

Establishing whether targeting the new pathways/mediators limits disease progression is a key first step in translation into the clinic. Especially compounds that efficiently limit (or even reverse) disease progression when administered after disease onset are prime candidates to further pursue in (clinical) research.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

To achieve our primary objective, wild type and/or genetically modified mice will be subjected to models of bleomycin-induced pulmonary fibrosis to obtain proof of principle for the new pathway/mediator to be involved in pulmonary fibrosis. If the new pathway/mediator indeed affects pulmonary fibrosis, subsequent studies will be performed to elucidate the underlying mechanism and to determine whether targeting the pathway/mediator also limits disease progression. Importantly, potential pathway/mediator involved in pulmonary fibrosis will be selected based on *in vitro* experiments using (patient-derived) fibroblasts and/or epithelial cells. Only pathways/mediators that modify fibrotic properties of these cells (like proliferation, differentiation or extracellular matrix production), will be tested in the *in vivo* animal model. Alternatively, pathways/mediators to be tested may be selected based on patient-derived data. For instance, pathways/mediators highly expressed in pulmonary fibrosis patients but not in controls may be selected for proof of principle studies. Finally, pathways/mediators may be selected from literature. Indeed, pathways/mediators that modify (for instance) kidney or liver fibrosis may be selected based on the notion that these disorders are driven by similar biological pathways.

For selected pathways/mediators, we envision a standard set of experiments to be performed (Figure 2; for details about the experiments, see 3.4.2):

1. Proof of principle: First, we aim to determine whether experimental pulmonary fibrosis is affected in genetically modified mice to obtain proof of principle that the pathway/mediator is involved in pulmonary fibrosis.

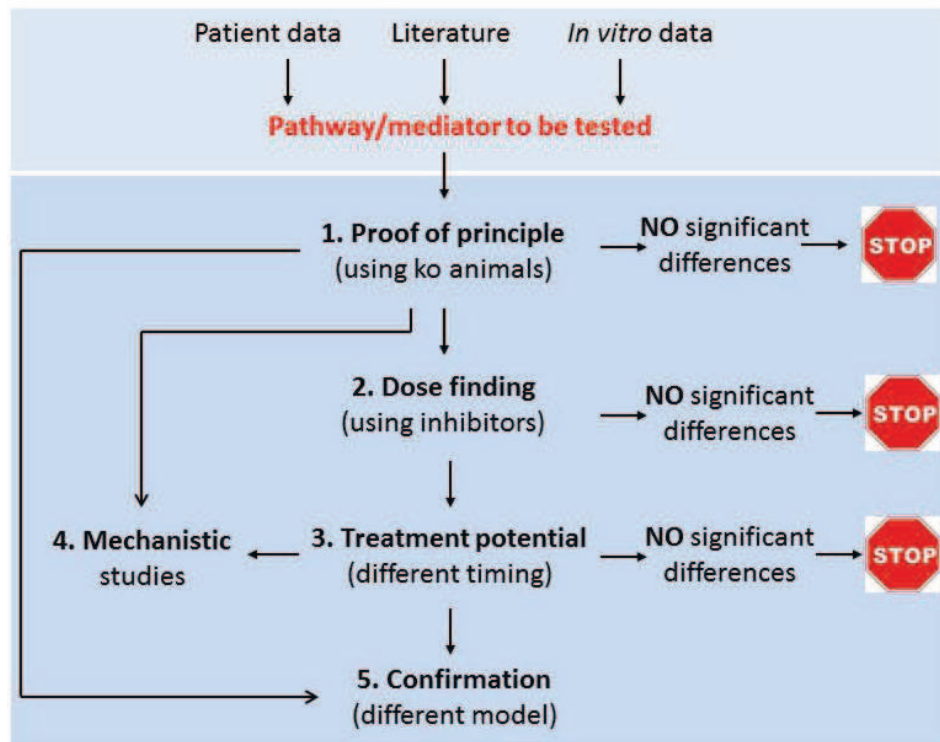


Figure 2: Strategy of the project as outlined in detail in the text. Only if specific GO criteria are met, subsequent experiments will be performed (for details, see 4.2.2).

2. Dose finding: In case fibrosis is modified in the genetically modified mice, the next aim will be to determine whether pharmacological targeting the pathway/mediator diminishes experimental pulmonary fibrosis. As a first step, in this part of the project, we will test different concentrations of the pharmacological inhibitor to assess whether pharmacological inhibition also limits fibrosis and to obtain the optimal dose for follow up experiments.

3. Treatment potential: If any of the inhibitor concentrations tested in the dose finding experiment limits pulmonary fibrosis, we will next determine whether delayed treatment (i.e. after the onset of fibrosis) still effectively limits fibrosis. This is particularly relevant as patients will never be treated before disease onset and these experiments thus provide information on the potential therapeutic importance.

4. Mechanistic studies: In case knock out animals (tested in proof of principle experiment) or pharmacological inhibition (tested in the dose finding experiment) reduces fibrosis, we aim to elucidate the underlying mechanism by which the pathway/mediator limits fibrosis. This is particularly relevant as the underlying mechanisms by which pathways/mediators contribute to disease progression is essential to fully understand the aetiology of pulmonary fibrosis.

5. Confirmation experiments: Experiments 1-4 will be addressed using a single pulmonary fibrosis model (as indicated in Figure 1; see 3.4.2 for details). Although we opt for the best available model to perform experiments 1-4, the model (as actually all animal models) does not fully recapitulate disease progression in the clinical setting. Consequently, we aim to validate key findings in an alternative model of pulmonary fibrosis. In case the tested pathway/mediator also drives pulmonary fibrosis in such an alternative model, the pathway/mediator is more likely to drive fibrosis in a more general nature which obviously enhances the translational potential of our findings.

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

Experiments 1-4 as indicated above (3.4.1) will be performed using an intranasal bleomycin-induced pulmonary fibrosis model. As already indicated, we opt for this model as it is the best described pre-clinical model of human lung fibrosis that has been widely used to study mechanisms involved in

fibrogenesis. Moreover, we opt for this model as we have ample experience with this particular model. Importantly however, although the bleomycin model is the best available model to study pulmonary fibrosis, it does not completely mimic the progression of fibrosis in IPF patients. For example, the spontaneous resolution of fibrosis in this model fails to represent the irreversibility seen in IPF patients. Consequently, it is pivotal to evaluate pathways/mediators that show promising effects in the intranasal model in an alternative experimental model before translating these findings into clinical studies. As alternative model for the confirmation experiments (experiment 5), we opt to use a model in which bleomycin is systemically delivered using Alzet minipumps (continuous delivery of bleomycin; see Appendix 2). This latter model, which is only recently described in literature and not yet well established, seems to result in limited inflammation and collagen deposition restricted to the subpleural area and mimics scleroderma-related pulmonary fibrosis. The necessity to implant minipumps suggest that animal discomfort may be higher in this model as compared to the intranasal model and consequently we opt to use this model only for the confirmation experiments.

In case the consensus in scientific literature would change over the next years and the systemic model would be considered scientifically superior over the intranasal model (i.e. better mimic the clinical situation of IPF), we will start new projects with the systemic model and may use the intranasal model to confirm our data.

As already indicated at 3.4.1 and shown in figure 2, experiments will be performed in a step-wise manner and we will not perform experiments 1-5 for all pathways/mediators. Based on specific Go / No Go criteria, we will limit the number of experimental animals used. In detail, we plan the following experiments based on the indicated Go / No Go criteria:

Experiment 1 – Proof of principle (Figure 3): Wild type and specific genetically modified mice are subjected to the bleomycin-induced pulmonary fibrosis model and mice are sacrificed at different time points during the fibrotic phase. Subsequent analysis of fibrotic markers reveals the importance of the studied pathway/mediator in the development of pulmonary fibrosis. In case no genetically modified animals are available, wild type mice may be made deficient by viral approaches.



Figure 3: Schematic overview of the proof of principle experiments in which wildtype and pathway specific genetically modified mice are treated with bleomycin after which fibrosis development is assessed at different time points.

Go/No Go criteria: No significant difference between wild type and genetically modified mice → NO GO.
 Significant difference between wild type and deficient mice → GO to exp 2, 4 and 5.
 No deficient mice available → GO to exp 2.

Experiment 2 – Dose finding (Figure 4): Wild type mice will be treated with different concentrations of a specific inhibitor of the pathway/mediator to be tested. Treatment will be started before the induction of fibrosis. Mice are subsequently sacrificed at the optimal time point as determined in the proof of principle experiment (largest difference between wild type and deficient mice).

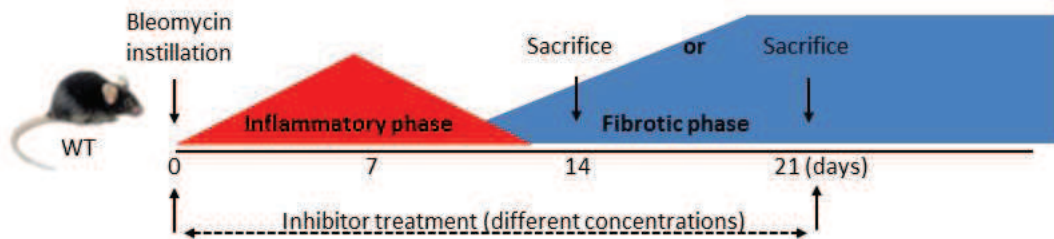


Figure 4: Schematic overview of the dose finding experiments in which wildtype mice are treated with different concentrations of pathway specific inhibitors starting before the induction of fibrosis.

Go/No Go criteria: Inhibitor does not significantly limit fibrosis → NO GO.
 Inhibitor does significantly inhibit fibrosis → GO to exp 3.

Experiment 3 – Treatment potential (Figure 5): Wild type mice will be treated with the optimal dose of inhibitor (defined from literature or from the dose finding experiment) starting after the onset of fibrosis. Mice are subsequently sacrificed at the optimal time point as determined in the proof of principle experiment.



Figure 5: Schematic overview of the treatment potential experiments in which wildtype mice are treated with the optimal concentration of pathway specific inhibitor after which fibrosis development is assessed. Importantly, treatment is started after the onset of fibrosis to mimic the clinical situation in which treatment can only be started after diagnosis (and thus onset of fibrosis).

Go/No Go criteria: Inhibitor does not significantly limit fibrosis → NO GO.
 Inhibitor does significantly inhibit fibrosis → GO to exp 4 and 5.

Experiment 4 – Mechanistic studies (Figure 6): Wild type and/or genetically modified mice are treated with specific inhibitors after which mice are sacrificed at different time intervals. Typical experiments may consist of wild type and deficient mice treated with a specific inhibitor to assess whether the effect of the inhibitor is indeed dependent on the presence of its target (i.e. the inhibitor should only affect fibrosis in wild type mice but not in deficient mice lacking the pathway/mediator the inhibitor is targeting). Alternatively, treated mice may be sacrificed at different time points after bleomycin-instillation to obtain insight in biological processes affected by the inhibitor (or deficient gene). Early time points will be studied to assess the effect on inflammation and epithelial injury whereas later time points (day 28) may be studied to assess whether fibrosis is really diminished or “just” delayed.

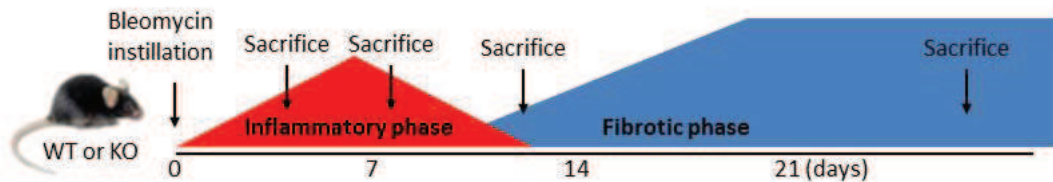


Figure 6: Schematic overview of the mechanistic experiments in which wildtype mice and pathway specific genetically modified mice are sacrificed at different time points after bleomycin instillation.

Experiment 5 - Confirmation studies (Figure 7): Wild type and/or genetically modified mice treated (or not) with specific inhibitors are subjected to the systemic bleomycin-induced pulmonary fibrosis model. As this model is not well described yet, and not yet used in our laboratory, we will first perform a pilot experiment (according to the scheme depicted below) to assess the optimal time point of sacrifice in subsequent experiments. To this end, wild type mice are subjected to the model and they are sacrificed after different time intervals. Subsequently, the amount of fibrosis will be assessed and the optimal time point for future experiments is defined by the following criteria: 1. High amount of fibrosis; 2. Low variability in the amount of fibrosis and 3. minimal discomfort. This pilot experiment also allows us to perform a power analysis to determine whether the proposed group size of 8 mice is sufficient for scientifically sound experiments.



Figure 7: Schematic overview of the initial pilot experiment of the systemic bleomycin model resulting in a limited inflammatory response followed by a robust fibrotic phase. Based on this pilot experiment in which mice are sacrificed at different time points (i.e. days 14, 21 or 28), the optimal time point of sacrifice will be selected for subsequent experiments.

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.

All individual experiments are tightly interconnected as indicated above. For every single novel pathway/mediator to be studied, we will start with a proof of principle experiment. In case these proof of principle experiments are negative, no additional experiments will be performed. Only in case the proof of principle experiments are showing a decrease in fibrosis, we will pursue the efficacy of pharmacological inhibition (experiments 2 and 3) and aim to elucidate the underlying mechanism by which fibrosis is decreased (experiment 4). Pathways/mediators with a large impact on fibrosis, and a consequent large decrease in fibrosis in either knock out mice or after pharmacological inhibition, will be validated in an alternative fibrosis model (experiment 5).

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Intranasal bleomycin-induced pulmonary fibrosis
2	Systemic bleomycin-induced pulmonary fibrosis
3	
4	



Appendix

Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website (www.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'.	11800	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Academic Medical Center Amsterdam	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	Intranasal bleomycin-induced pulmonary fibrosis

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.

Mice will be subjected to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. At different time intervals, mice will be sacrificed and pulmonary fibrosis is assessed using standard assays. Specifically, we will quantify collagen levels (as accumulation of this extracellular matrix protein is the major feature of pulmonary fibrosis) using hydroxyproline assays, and histological changes using the Ashcroft score (a numeric scale of fibrosis). Moreover, immunohistological stainings for macrophages, extracellular matrix proteins and endothelial cells may be performed to identify underlying mechanisms.

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

Bleomycin will be administered intranasally (maximal 50 µl). Mice may be treated with potential inhibitors of fibrosis from the start of the experiment or after the induction of fibrosis (max 1-2 times/day). Inhibitors may be applied subcutaneously, intraperitoneally, intravenously, orally or intranasally depending on the specific inhibitor with maximal volumes as described in Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15-23, 2001. In certain experiments, blood may be collected at different time intervals before and after the induction of fibrosis (maximal 8 ml/kg/2 weeks or 7.5% of the blood volume/week; according to Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15-23, 2001). At the end of the experiment, mice will be sacrificed under anaesthesia. Just before sacrifice, lungs may be flushed to obtain bronchoalveolar lavage fluid (BAL). During the experiment, mice will be weighed to assess animal discomfort (in general twice a week but daily in case large weight loss is observed).

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

Most importantly, power calculations will be performed to determine the smallest group size necessary to obtain significant findings. We will continuously repeat the power calculations to adjust group sizes in subsequent experiments based on the most recent data (most recent power calculation indicates that with a standard deviation of 35% we need 8 mice to show a difference of >50% with a power of 80%). We will use Student's t-tests for comparisons between two groups or 1-way anova for comparisons between multiple groups. Furthermore, obtained results will guide subsequent experiments (like for instance, delayed treatment experiments will only be performed in case previous experiments already provided proof of principle that the targeted pathway/mediator modifies pulmonary fibrosis).

B. The animals

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

- mus musculus (as genetically modified mice are available, and the availability of a good model in mice).
- Both male and female mice will be used (as this minimises the number of knock out mice to be bred). Moreover, the combined use of males and females allows to analyse whether pathways/mediators may act in a gender specific manner).
- Wild type and genetically modified (lacking or overexpressing potential fibrotic mediators) mice.
- Mice between 10 and 14 weeks of age (adult mice over 20 g, as we observed previously that bleomycin may cause a larger drop in body weight in younger/lighter mice).

- Mice (genetically modified and wild type controls) will be bred at the Academic Medical Center Amsterdam, whereas wild type mice may also be purchased from licenced companies like Charles River or Harlan.
- The maximal number of mice needed to perform all experiments proposed within the 5 years of the project will be around 840. This number is based on typical experiments (as outlined in figures 2-7 in the project proposal) with 40 mice for a proof of principal experiment (4 experimental groups; i.e. wildtype and KO mice sacrificed at two different time points; and 4 controls naïve mice per genotype), 48 mice for a dose finding experiment (6 experimental groups; i.e. 3 concentrations of inhibitor and 3 solvent controls), 40 mice for the treatment potential experiment (5 experimental groups; i.e. no treatment, and treatment (or solvent control) started at two different time points) and 48 mice for mechanistic studies (6 experimental groups; i.e. single dose treatment (and solvent control) with 3 time points of sacrifice). Furthermore, we will analyse maximally 2 different pathways/mediators every year (of which half will not pass the GO criteria in experiment 1 or 2).

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 – Pulmonary fibrosis is a complex process involving multiple cell types (epithelial cells, fibroblasts, endothelial cells, immune cells) that interact in a space and time dependent manner ultimately leading to fibrosis. These complex interactions cannot be accurately mimicked *in vitro* and consequently we do need experimental animals. All animal experiments will however be based on solid scientific evidence (either obtained ourselves using *in vitro* / patient data or derived from literature) suggesting that a pathway/mediator is involved in fibrosis.

Refinement - To minimize animal discomfort as much as possible, we will employ anaesthesia (as indicated above in the description of the procedure), whereas we will monitor the mice for signs of discomfort and apply humane endpoints (see for details section "Classification of discomfort/humane endpoints" below). In general, animal discomfort will be monitored twice a week but in case discomfort is observed (like large weight loss), daily checks will be in place. In case weight loss is severe (>15%) mice will receive wet food. To further refine the experiments, mice are housed in groups (if possible) in enriched cages with appropriate bedding and free access to food and water. Moreover, we will use mice above 20 grams body weight (10-14 weeks of age) as we previously observed that bleomycin may cause a larger drop in body weight in lighter mice after intranasal administration. Finally, pathway specific inhibitors will preferentially be administered orally or intranasally. In case such an approach is not feasible (for instance when the inhibitor would not be active by such administration), the preferred route of administration will be subcutaneously > intraperitoneally > intravascular.

Reduction - To reduce the number of mice to be used as much as possible, we will use minimal group sizes to obtain significant differences, and we will continue to monitor variability in our experiments to adjust the (minimal) necessary group size in subsequent experiments. Moreover, results obtained in experiments will guide future experiments as indicated above. Finally, we aim to reduce the number of control groups used in the experiments by combining different experiments (if possible), and we will minimize the number of mice to be bred by using a homozygous breeding strategy and by using both male and female mice.

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

The intranasal administration of bleomycin will be performed by experienced biotechnicians to minimize discomfort. To avoid effects on the environment we will strictly follow the D-I and DM-II guidelines for animal experiments (which will be performed in a high health-status, restricted-entry mouse barrier facility of the AMC). Adverse effects on the environment are further minimized by the fact that only organs/tissues taken from mice will be transported to the Laboratory in double sealed containers after which the organs/tissues are analysed in appropriate (ML-I/ML-II) laboratories.

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.

nvt

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 animal 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.

Bleomycin is administered under anaesthesia, whereas mice are also sacrificed under anaesthesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

After bleomycin administration mice show a temporary decrease in body weight peaking at around day 10-12 after which their body weight recovers. Occasionally, weight loss does not recover.

Explain why these effects may emerge.

The weight loss is probably due to bleomycin-induced inflammation and loss of appetite.

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

Excessive weight loss is prevented/limited by using mice above 20 g body weight (as the severe weight loss mostly occurs in slightly lighter mice). In case weight loss is >15% (but less than the humane endpoint of 20% body weight loss) without any additional sign of discomfort, mice will receive wet food and they will be more extensively monitored for discomfort. As soon as their body weight increases, mice will return to normal food.

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.

(1) bad overall behaviour (rough fur, hunched back, walking on its toes, diarrhea), (2) weight loss of >15% compared to highest body weight measured in combination with any sign of discomfort, (3) weight loss of >20% compared to highest body weight measured without any sign of discomfort.

Indicate the likely incidence.

<10%

K. Classification of severity of procedures

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

The discomfort of mice subjected to the systemic bleomycin model consists of:

- Intranasal bleomycin administration → mild discomfort
- Injections (drugs/inhibitors/etc) → mild discomfort
- Blood sampling (only in some mice) → mild discomfort
- Development of fibrosis → moderate discomfort

- Bronchoalveolar lavage and sacrifice → terminal

Overall, we expect the discomfort to be moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

We need to analyse fibrosis in the lungs of the mice, and consequently we need to collect the lungs.

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'.	11800	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Academic Medical Center Amsterdam	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 2	Type of animal procedure Systemic bleomycin-induced pulmonary fibrosis

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.

Mice will be subjected to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. At different time intervals, mice will be sacrificed and pulmonary fibrosis is assessed using standard assays. Specifically, we will determine hydroxyproline levels, collagen deposition and Ashcroft scores to assess the extent of fibrosis, whereas immunohistological stainings for macrophages, extracellular matrix proteins and endothelial cells may be performed to identify underlying mechanisms.

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

Bleomycin will be administered via osmotic minipumps that are implanted under the loose skin on the back of the mice (using pain killing and anesthesia). Mice may be treated with potential inhibitors of fibrosis from the start of the experiment or after the induction of fibrosis (max 1-2 times/day). Inhibitors may be applied subcutaneously, intraperitoneally, intravenously, orally or intranasally depending on the specific inhibitor with maximal volumes as described in Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15–23, 2001. In certain experiments, blood may be collected at different time intervals before and after the induction of fibrosis (maximal 8 ml/kg/2 weeks or 7.5% of the blood volume/week; according to Diehl et al, J. Appl. Toxicol. 21, 15–23, 2001). At the end of the experiment, mice will be sacrificed under anaesthesia. Just before sacrifice, lungs may be flushed to obtain bronchoalveolar lavage fluid (BAL). During the experiment, mice will be weighed to assess animal discomfort (in general twice a week but daily in case large weight loss is observed).

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

Most importantly, power calculations will be performed to determine the smallest group size necessary to obtain significant findings. We will continuously repeat the power calculations to adjust group sizes in subsequent experiments based on the most recent data. Furthermore, obtained results will guide successive experiments (like for instance, delayed treatment experiments will only be performed in case previous experiments already provided proof of principle that the targeted pathway/mediator modifies pulmonary fibrosis).

In a first pilot experiment, we will determine the variability in outcome measures which will allow us to perform a power analysis to determine whether the proposed group size of 8 mice (based on Urawa M, J Thromb Haemost 14:1588-99, 2016) is sufficient for scientifically sound experiments.

B. The animals

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

- mus musculus (as genetically modified mice are available, and the availability of a good model in mice).
- Both male and female mice will be used (as this minimises the number of knock out mice to be bred). Moreover, the combined use of males and females allows to analyse whether pathways/mediators may act in a gender specific manner).
- Wild type and genetically modified (lacking or overexpressing potential fibrotic mediators) mice.
- Mice between 10 and 14 weeks of age (adult mice over 20 g, as we observed previously that bleomycin may causes a large drop in body weight in younger/lighter mice).

- Mice (genetically modified and wild type controls) will be bred at the Academic Medical Center Amsterdam, whereas wild type mice may also be purchased from licenced companies like Charles River or Harlan.

- The maximal number of mice needed to perform all experiments proposed within the 5 years of the project will be around 160. This number is based on a pilot experiment to establish the optimal time point of sacrifice (as outlined in figures 7 in the project proposal; three time points of sacrifice and a control group leading to 32 mice) and subsequent typical experiments with 32 mice (4 experimental groups; i.e. treatment (and solvent control) started at two different time points). Furthermore, we envision to test 1 pathway/mediator per year and thus 4 pathways/mediators during the project.

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 – Pulmonary fibrosis is a complex process involving multiple cell types (epithelial cells, fibroblasts, endothelial cells, immune cells) that interact in a spatial and temporal dependent manner ultimately leading to fibrosis. These complex interactions cannot be accurately mimicked *in vitro* and consequently we do need experimental animals. All animal experiments will however be based on solid

scientific evidence (either obtained ourselves using *in vitro* / patient data or derived from literature) suggesting that a pathway/mediator is involved in fibrosis.

Refinement - Due to the implantation of osmotic pumps, we envision that this particular systemic model causes more discomfort than the intranasal model (as outlined in "Bijlage 1"). Consequently, we will primarily use this particular model only to validate key findings obtained using the intranasal model.

To minimize animal discomfort as much as possible, we will employ anaesthesia and pain killing (as indicated above in the description of the procedure), whereas we will monitor the mice for signs of discomfort and apply humane endpoints (see for details section "Classification of discomfort/humane endpoints" below). In general, animal discomfort will be monitored twice a week but in case discomfort is observed (like large weight loss), daily checks will be in place. In case weight loss is severe (>15%) mice will receive wet food. To further refine the experiments, mice are housed in groups (if possible) in enriched cages with appropriate bedding and free access to food and water. Moreover, we will use mice above 20 grams body weight (10-14 weeks of age) as we previously observed that bleomycin may cause a larger drop in body weight in lighter mice after intranasal administration. Finally, pathway specific inhibitors will preferentially be administered orally or intranasally. In case such an approach is not feasible (for instance when the inhibitor would not be active by such administration), the preferred route of administration will be subcutaneously > intraperitoneally > intravascular.

Reduction - To reduce the number of mice to be used as much as possible, we will use minimal group sizes to obtain significant differences, and we will continue to monitor variability in our experiments to adjust the (minimal) necessary group size in subsequent experiments. Moreover, results obtained in experiments will guide future experiments as indicated above. Moreover, we aim to reduce the number of control groups used in the experiments by combining different experiments (if possible), and we will minimise the number of mice to be bred by using a homozygous breeding strategy and by using both male and female mice.

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

As indicated above, we will use anaesthesia and pain killing if necessary. To avoid effects on the environment we will strictly follow the D-I and DM-II guidelines for animal experiments (which will be performed in a high health-status, restricted-entry mouse barrier facility of the AMC). Adverse effect on the environment are further minimised by the fact that only organs/tissues taken from mice will be transported to the Laboratory in double sealed containers after which the organs/tissues are analysed in appropriate (ML-I/ML-II) laboratories.

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.

nvt

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 and analgesics used in order to implant Alzet minipumps, whereas mice are sacrificed under anaesthesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

We did not yet use this particular model (bleomycin administration via osmotic pumps) in our department, but literature suggests that mortality is around 10% in this model.

Explain why these effects may emerge.

Most likely, this is due to disease progression (i.e. pulmonary fibrosis).

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

Weight loss will be monitored carefully and mice will be sacrificed if weight loss is above the predefined humane end point. Moreover, during the selection of the optimal time point for sacrifice (as based on a pilot experiment as indicated above) mortality is included as an important selection criterion and we may thus select a time point at which mortality is low (or absent).

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.

(1) bad overall behaviour (rough fur, hunched back, walking on its toes, diarrhea), (2) weight loss of >15% compared to highest body weight measured in combination with any sign of discomfort, (3) weight loss of >20% compared to highest body weight measured without any sign of discomfort.

Indicate the likely incidence.

10%.

K. Classification of severity of procedures

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

The discomfort of mice subjected to the systemic bleomycin model consists of:

- Pump placement under anaesthesia → analgetics used → mild discomfort
- Recovery from surgery/anaesthesia → analgetics used → moderate discomfort
- Injections (drugs/inhibitors/etc) → mild discomfort
- Blood sampling (only in some mice) → mild discomfort
- Development of fibrosis → moderate discomfort
- Bronchoalveolar lavage and sacrifice → terminal

Overall, we expect the discomfort to be moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

We need to analyse fibrosis in the lungs of the mice, and consequently we need to collect the lungs.

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.

A. Algemene gegevens over de procedure

Bij de punten 1 t/m 7 dienen altijd de gevraagde gegevens te worden ingevuld.

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project Novel treatment options for pulmonary fibrosis
3. Titel van de NTS Betera behandelmogelijkheden voor longfibrose
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC
 - telefoonnummer contactpersoon
 - e-mailadres contactpersoon
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken 26-01-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van / tot
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag
 - advies aan CCD
7. Afstemming IvD

De relevante onderdelen van de vergunningaanvraag (projectvoorstel en bijlagen) zijn in een traject voorafgaand aan de indiening ervan bij de DEC in overleg met de IvD tot stand gekomen.
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 n.v.t.
 - Datum
 - Gestelde vraag/vragen
 - Datum antwoord
 - Verstrekt(e) antwoord(en)

- De antwoorden hebben ~~wel~~/niet 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)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is.

>Ja

Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.

2. De aanvraag betreft > een nieuwe aanvraag.

3. Is de DEC competent om hierover te adviseren?

> Ja

4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom.

> Nee

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 (het onderzoeken van de potentiële rol van nieuwe pathways/mediatoren in longfibrose en het vaststellen van de onderliggende mechanismen). Dit project kan getypeerd worden als een project met vijf subdoelen die onderling een relatie hebben en een tijdsafhankelijkheid hebben. De vijf subdoelen zijn:

- I) Een proof-of-principle experiment met een KO muis: het vaststellen van de rol van een bepaald gen;
- II) Een dosis respons experiment met een inhibitor: vaststellen of het farmacologisch remmen van dit gen de ontwikkeling van longfibrose verbetert;
- III) Vaststellen van een behandelingsprotocol;
- IV) Mechanistische studie; na de bevinding dat het KO model of farmacologisch remmen fibrose vermindert, zal het onderliggende mechanisme bestudeerd worden.
- V) Bevestiging in tweede long fibrose model: de resultaten van 1-4 worden bevestigd in een tweede model

De subdoelen zijn in een logische volgorde opgesteld. Er wordt eerst vastgesteld of een KO muis een verbetering laat zien in de ontwikkeling van longfibrose. Vervolgens wordt onderzocht of dit ook farmacologisch geremd kan worden (indien er geen KO muis beschikbaar is, wordt met deze stap begonnen). Indien dit mogelijk blijkt wordt gekeken of de inhibitor ook therapeutisch gebruikt kan worden (nadat longfibrose

zich al ontwikkeld heeft). Na het vaststellen van de betrokkenheid van de nieuwe pathway/mediator wordt het onderliggende mechanisme verder onderzocht. Tenslotte worden de belangrijkste bevindingen getest in een tweede longfibrose model. Bij iedere stap naar het volgende experiment is een Go/No Go beslissing ingebouwd. Bij een niet significant verschil wordt geen vervolg onderzoek gedaan naar het volgende subdoel. Dit maakt de aanvraag tot een navolgbaar geheel. Het project lijkt haalbaar, afgaande op het voorwerk en de ervaring van deze onderzoekers, de omvang en de aangegeven tijdsspanne.

Het is helder welke handelingen en ongerief individuele dieren zullen ondergaan in de dierproeven die nodig zijn om de subdoelen te bereiken.

Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Geef aan of er aspecten in deze aanvraag zijn die niet in overeenstemming zijn met wet- en regelgeving anders dan de Wod? Denk hierbij aan bijvoorbeeld de Flora en fauna wet en Wet dieren. Indien van toepassing, leg uit om welke aspecten het gaat en waarom hier sprake van is.
 - > Niet, voor zover kan worden opgemaakt uit de aanvraag.
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 aangekruiste doelcategorieën sluiten aan bij de hoofddoelstelling. Er wordt fundamenteel onderzoek gedaan naar de rol van nieuwe pathways/mediatoren in de ontwikkeling van longfibrose. Er wordt ook onderzoek gedaan naar potentiële geneesmiddelen die de longfibrose kunnen remmen. Dit maakt het onderzoek zowel fundamenteel als translationeel.

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een reële relatie is tussen beide doelstellingen (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*).
 - > Het directe doel van het project is inzicht te verkrijgen over de rol van nieuwe pathways/mediatoren in longfibrose en het vaststellen van de onderliggende mechanismen.

Het uiteindelijke doel van het project is om betere medicatie te ontwikkelen die longfibrose tegen kan gaan of zelfs kan verminderen. Het directe doel vormt een logisch en onmisbaar deel van de route naar het uiteindelijke doel en heeft daardoor een reële relatie.
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 en translationele project dat gericht is op het verkrijgen van meer inzicht in de rol van nieuwe pathways/mediatoren in longfibrose, zijn de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten die longfibrose ontwikkelen.

Waarden die voor proefdieren in het geding zijn: de dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress en pijn ondervinden. Waarden die voor de onderzoekers bevorderd worden: zij zullen kennis

verkrijgen. Ook zullen de carrièremogelijkheden van de onderzoekers verbeteren door publicaties en mogelijk patenten.

Waarden die voor patiënten met longfibrose bevorderd worden: het ontwikkelen van therapieën die de ontwikkeling van longfibrose kunnen remmen of zelfs kunnen verminderen.

6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en of geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wetgeving.

> Er is geen sprake van substantiële milieueffecten, voorzover de DEC dit kan overzien.

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw antwoord toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*).

> De IvD ziet erop toe dat alle personen die bij dit onderzoek betrokken zullen zijn, zowel de analisten en onderzoekers die de experimenten gaan uitvoeren, als de onderzoekers die het project hebben vormgegeven en opgeschreven, voldoen aan de wettelijke eisen van deskundigheid en kennis.

De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met het voorgestelde muismodel voor longfibrose. De onderzoekers hebben het bleomycine longfibrose model gepubliceerd en volledig ontwikkeld en zijn bewezen bekwaam in dit onderzoek

Wij achten de kennis en kunde van de onderzoeksgroep voldoende gewaarborgd.

8. Beoordeel of het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen en of de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Licht uw antwoord toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C6*).

> De opzet van het project en van alle experimenten die worden ingezet voor elk van de subdoelen, is logisch en goed te begrijpen. De aangegeven doelstelling kan met deze experimentele aanpak behaald worden. Er wordt gestart met een "proof-of-principle" proef waarin de betrokkenheid van een gen in de ontwikkeling van longfibrose in een KO-muis bepaald wordt. Vervolgens wordt onderzocht of dit ook met een farmacologische remmer behaald kan worden, daarna wordt een behandelingsprotocol ontwikkeld en wordt onderzocht of het ook therapeutisch gebruikt kan worden (na het ontstaan van longfibrose). Indien dit het geval is wordt ook het onderliggende mechanisme verder onderzocht. Tenslotte wordt onderzocht of de bevindingen bevestigd kunnen worden in een tweede proefdiermodel voor longfibrose, om de translatie naar de kliniek te verbeteren. Dit project is goed opgezet en kan leiden tot het behalen van de doelstelling.

Welzijn dieren

9. Geef aan of er sprake is van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Beoordeel of de keuze hiervoor voldoende wetenschappelijk is onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wod voor de desbetreffende categorie genoemde beperkende voorwaarden. Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C1; zie bijlage I voor toelichting en voorbeelden*).

- 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)

> Er is geen sprake van bijzondere dieren, omstandigheden of behandelingen.

10. Geef aan of de dieren gehuisvest en verzorgd worden op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de richtlijn. Indien niet aan deze minimale eisen kan worden voldaan omdat het om wetenschappelijke redenen noodzakelijk is hiervan af te wijken, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht toe waarom wel/niet.

> Er is voldaan aan bijlage III

11. Beoordeel of het ongerief als gevolg van de dierproeven realistisch is ingeschat en geclassificeerd, waarbij uitgegaan wordt van de kans op angst, pijn, stress en/of ziekte bij individuele dieren (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*).

> Ongriefinschatting is in overleg met de IvD tot stand gekomen, met gebruikmaking van de Toelichting Codering Ongrief

12. Geef aan op welke wijze de integriteit van de dieren wordt aangetast (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). (*zie bijlage I voor voorbeeld*).

> De "heelheid" van het dier wordt niet aangetast zodanig dat sprake is van vermindering of ontneming van soortspecifieke eigenschappen.

13. Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De humane eindpunten zijn helder gedefinieerd (uiterlijke kenmerken/>15%gewichtsverlies+tekenen van ongerief/>20% zonder tekenen van ongerief), en de inschatting van het percentage dieren (<10% in intranasale bleomycine model en 10% in het systemische bleomycine model) dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is per dierproef, op basis van ervaring van de onderzoeksgroep, realistisch ingeschat.

14. Beoordeel of de aanvrager voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn? Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
- > De samenhang tussen epitheliale cellen, fibroblasten, endotheliale cellen en cellen van het immuunsysteem is zeer complex. Dit kan niet worden nagebootst in een *in vitro* model. Vervanging van de aangevraagde dierproeven is hierdoor niet mogelijk, maar waar mogelijk maken de onderzoekers gebruik van *in vitro* experimenten, patiëntmateriaal of de literatuur om de meest geschikte mediators/pathways te selecteren voordat er een dierproef gedaan wordt.
15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Onderbouw uw antwoord (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
- > De aantallen dieren zijn ingeschat op basis van een power van 80% en een tweezijdige alpha van 0.05. De variatie en het te behalen verschil wordt, waar mogelijk, ingeschat op basis van eerdere experimenten om een zo klein mogelijke groepsomvang te gebruiken. Als deze gegevens niet beschikbaar zijn, dan wordt er gerekend met een variatie van 35% en een verschil van >50%. Dan zijn er acht muizen per groep nodig. Hierdoor wordt een realistische schatting gemaakt voor het aantal dieren dat nodig is om een statistisch significant verschil te behalen.
16. Beoordeel of het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project zodanig is opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd? Licht uw antwoord toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).
- > In dit project wordt anesthesie toegepast en worden de muizen goed in de gaten gehouden op het vertonen van tekenen van ongerief. Er zullen iets oudere muizen gebruikt worden, zodat ze wat zwaarder zijn. De behandeling met bleomycine veroorzaakt gewichtsverlies en eerdere proeven lieten zien dat zwaardere muizen minder gewichtsverlies laten zien dan lichtere muizen. Muizen die gewichtsverlies laten zien zullen geweekt voer aangeboden krijgen. De humane eindpunten zijn duidelijk geformuleerd, waarmee de mate van verfijning verder is geborgd.
17. Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Onderbouw uw antwoord.
- > n.v.t.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd? Geef ook aan welke maatregelen verder zijn getroffen om bij fok of aankoop van dieren het aantal in voorraad gedood te beperken (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3; zie bijlage I voor voorbeeld*).
- > Zowel mannelijk als vrouwelijke dieren zullen in gelijke mate worden ingezet.
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 wor-

den, geef aan of er een voor de diersoort passende dodingsmethode gebruikt wordt die vermeld staat in bijlage IV van de richtlijn. Zo niet, beoordeel of dit in voldoende mate is onderbouwd. Licht dit toe. Indien van toepassing, geeft ook aan of er door de aanvrager ontheffing is aangevraagd (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*).

> De dieren worden in het kader van de proef gedood volgens een methode van doden uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU. Doden is noodzakelijk omdat in het kader van het experiment de weefsels uit het dier moeten worden gehaald voor analyse.

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

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

> Ja, deze is in overleg met de afdeling communicatie van de vergunninghouder bewerkt met het oog op de begrijpelijkheid.

D. Ethische afweging

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

Rechtvaardigt het verkrijgen van meer inzicht in de rol die nieuwe pathways/mediatoren spelen in het ontwikkelen van longfibrose en het verkrijgen van inzicht in de onderliggende mechanismen, het matige ongerief dat de muizen als proefdieren in het onderzoek zullen ervaren?

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*).

De belangrijkste belanghebbenden in dit fundamentele en translationele project dat gericht is op ***het bevestigen of weerleggen van de potentiële rol van nieuwe pathways/mediatoren in longfibrose en het vaststellen van de onderliggende mechanismen***, zijn op korte termijn de proefdieren en de onderzoekers.

Op lange termijn bestaan de belanghebbenden uit de patiënten die lijden aan longfibrose. De muizen worden door dit onderzoek geschaad omdat het pijn en stress veroorzaakt. In

de muizenmodellen worden maximaal 1000 muizen gebruikt die een matig ongerief ondergaan.

De andere groep direct belanghebbenden, namelijk de onderzoekers, zullen door dit onderzoek hun fundamentele kennis en inzichten vergroten, welke gedeeld zullen worden met het wetenschappelijke veld. Aanvullende belangen van onderzoekers zouden kunnen zijn dat meewerken aan dit onderzoek hun carrièremogelijkheden vergroot door publicaties en dat zij nieuwe vindingen mogelijk kunnen patenteren.

Minder direct aanwezig zijn de waarden en belangen van patiënten. De inzichten die dit onderzoek zal opleveren, kunnen op termijn een belangrijke bijdrage leveren aan de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor longfibrose. In dit onderzoek worden ook specifieke remmers onderzocht die zouden kunnen leiden tot een therapie voor patiënten. Dit valt echter buiten het directe onderzoeksdoel van deze studie.

Hoewel maximaal 1000 muizen matig ongerief zullen ondergaan, acht de DEC dit gerechtvaardigd vanwege de verwachte gunstige gevolgen van dit onderzoek. De gekozen longfibrose modellen zullen matig ongerief veroorzaken in de muizen, maar de DEC erkent dat deze modellen de meest geschikte modellen zijn om deze vraagstelling in te beantwoorden. Het maatschappelijke belang van deze projectaanvraag is dat er meer inzicht komt in de onderliggende mechanismen in het ontstaan van longfibrose. Er worden verschillende farmacologische remmers onderzocht op hun potentie om longfibrose te voorkomen en zelfs te verbeteren als longfibrose zich al ontwikkeld heeft. De toepassing van dit inzicht in de behandeling van longfibrose zal nog jaren duren en ligt buiten dit voorstel. Het wetenschappelijke belang is in dit project duidelijk geformuleerd en dit projectvoorstel zal hier direct aan bijdragen.

De DEC waardeert de vermeerdering van fundamentele kennis over de etiologie van longfibrose op korte termijn als het meest zwaarwegende gevolg dat tegenover het maximaal matige ongerief van 1000 muizen staat. Dat het onderzoek ook nog maatschappelijke gevolgen heeft doordat de inzichten verkregen uit dit onderzoek in de toekomst kunnen worden gebruikt voor de behandeling van longfibrose weegt ook mee, zij het in mindere mate.

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*).

Betere behandelmogelijkheden voor longfibrose

De DEC is van mening dat het belang van het verkrijgen van nieuwe inzichten in de potentiële rol van nieuwe pathways en mediators in het ontwikkelen van longfibrose en inzicht in de onderliggende mechanismen (het wetenschappelijk belang), en op langere termijn, de bijdrage aan nieuwe therapieën voor longfibrose (het maatschappelijke belang), het matige ongerief dat de maximaal 1000 muizen in dit onderzoek zullen ervaren, rechtvaardigt.

De DEC acht het aannemelijk dat de doelstelling behaald zal worden. De kennis en kunde van de onderzoekers is aanwezig. Het wetenschappelijke belang van de doelstelling is duidelijk geformuleerd en zal de directe opbrengst zijn van dit onderzoek. Het maatschappelijke belang van de doelstelling is dat er meer inzicht komt in de onderliggende mechanismen van longfibrose en dat de effectiviteit van specifieke remmers onderzocht zal worden. De onzekerheid dat deze kennis daadwerkelijk bijdraagt aan een nieuwe therapie, is meegewogen in het advies. Voorafgaande

resultaten uit *in vitro* werk, patiëntmateriaal of de literatuur zullen gebruikt worden om nieuwe pathways en mediators te selecteren voor verder onderzoek in proefdieren.

Om de doelstelling te bereiken worden muizen als proefdieren gebruikt. Het matige ongerief dat de muizen ondergaan, komt door het veroorzaken van de longfibrose (bleomycine induceert een ontsteking en veroorzaakt verlies in eetlust en daardoor gewichtsverlies). De vraagstelling kan het beste beantwoord worden in een model voor longfibrose. De bleomycine geïnduceerde longfibrose modellen worden algemeen gebruikt in longfibrose onderzoek. De bevestiging van de resultaten in een tweede longfibrose model vergroot de kans dat het succesvol zal zijn in de kliniek. Het tweede model is ook door bleomycine geïnduceerd maar wordt systemisch toegediend. Dit is de beste keus omdat dit een ander ontstekingspatroon geeft in de long dan het intranasale model, andere "schade inductie" modellen zijn vergelijkbaar met het acute intranasale bleomycine model. De noodzaak van het gebruik van longfibrose modellen weegt mee in de afweging tussen het matige ongerief van de dieren ten opzichte van de belangen.

De onderzoekers beperken het ongerief van de dieren door verschillende maatregelen (veel ervaring met de modellen, duidelijk geformuleerde humane eindpunten met voldoende controle momenten, aanbod van gewekt voer bij gewichtsverlies, en er worden zwaardere muizen gebruikt die minder gewichtsverlies laten zien dan lichtere muizen).

De DEC is bovendien van mening dat de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven wetenschappelijke doelstellingen en dat de gekozen strategie en de experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen de kaders van het project. De DEC is er verder van overtuigd dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om de doelstelling te behalen. Tevens verwacht de DEC op basis van deze aanvraag dat de aanvrager voldoende maatregelen treft om zowel het ongerief van de dieren alsmede het aantal benodigde dieren tot een minimum te beperken. De aanvrager heeft volgens de DEC overtuigend aangegeven dat gebruik van muizen voor het behalen van het directe doel noodzakelijk is en dat er geen geschikte proefdiervrije alternatieven mogelijk zijn.

Gezien het bovenstaande is de DEC van mening dat dit project het gebruik van proefdieren rechtvaardigt.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen.**

- De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden
 - 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*).

Dit DEC-advies is unaniem tot stand gekomen.

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

Er zijn geen knelpunten of dilemma's naar voren gekomen bij dit projectvoorstel.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academic Medical Center Amsterdam

Meibergdreef 31
1105 AZ 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
AVD118002017845

Bijlagen

2

Datum 14 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 14 februari 2017. Het gaat om uw project "Novel treatment options for pulmonary fibrosis". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD118002017845. 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:

14 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD118002017845

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
14 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017845

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11800
Naam instelling of organisatie: Academic Medical Center Amsterdam
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 343362777
Straat en huisnummer: [REDACTED]
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM
IBAN: NL68RABO0136166741
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: AMC

Gegevens 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

Datum:

14 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD18002017845

Over uw project

Geplande startdatum:

1 januari 2018

Geplande einddatum:

31 december 2022

Titel project:

Novel treatment options for pulmonary fibrosis.

Titel niet-technische samenvatting:

Betere behandelmogelijkheden voor longfibrose.

Naam DEC:

DEC AMC

Postadres DEC:

Meibergdreef 31

E-mailadres DEC:

[REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1.287,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

Ondertekening

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Amsterdam

Datum:

10 februari 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

AMC crediteurenadministratie
Postbus Postbus 400
1115 ZJ Duivendrecht



**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
AVD118002017845

Bijlagen

2

Datum 14 februari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 14 februari 2017
Vervaldatum: 16 maart 2017
Factuurnummer: 170845
Ordernummer: Kostenplaatsnummer [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD118002017845	€ 1.287,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Academic Medical Center Amsterdam

Meibergdreef 31
1105 AZ 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
AVD118002017845
Bijlagen
1

Datum 5 april 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [redacted]

Op 14 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Novel treatment options for pulmonary fibrosis." met aanvraagnummer AVD118002017845. 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 "Novel treatment options for pulmonary fibrosis." starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC AMC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 14 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:
5 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD118002017845

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:



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: Academic Medical Center Amsterdam
Adres: Meibergdreef 31
Postcode en plaats: 1105 AZ AMSTERDAM
Deelnemersnummer: 11800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Novel treatment options for pulmonary fibrosis." met aanvraagnummer AVD118002017845, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC AMC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Associate professor.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 14 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 27 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 27 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 14 februari 2017, ontvangen op 14 februari 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Intranasal bleomycin-induced pulmonary fibrosis				In het hele project worden maximaal 1000 dieren gebruikt.
	Muizen (Mus musculus) /	1.000	100% Matig	
3.4.4.2. Systemic bleomycin-induced pulmonary fibrosis				In het hele project worden maximaal 1000 dieren gebruikt.
	Muizen (Mus musculus) /	1.000	100% Matig	

Voorwaarden

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

Aanvraagnummer:

AVD118002017845

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:
AVD118002017845

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 onverantwoord 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:

AVD118002017845

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 W17-09									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2017846								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud			x					
6	DEC-advies			x					
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
9	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
10	Bijlage beschrijving dierproeven 1 nieuw			x					
11	Bijlage beschrijving dierproeven 2 nieuw			x					
12	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
13	Aanvullende vraag			x			x	x	
14	Reactie aanvullende vraag			x			x	x	
15	Advies CCD		x						x
16	Beschikking en vergunning			x			x	x	



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

01 FEB. 2017

- 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 Biofarmacie, faculteit betawetenschappen 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 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 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Nieuwe medicijnen met vetoplosbare geneesmiddelen voor cholestatische patiënten
- 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 € 1287 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
 Via een eenmalige incasso
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

Utrecht
 21-01-2017



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.

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.

More and more new medicines have an active pharmaceutical ingredient (API) that is lipophilic and therefore barely soluble in water. This limits the oral bioavailability of the API, since it needs to be dissolved in the fluids of the intestinal lumen. The body has developed a mechanism to be able to absorb lipophilic components, like vitamins and food. This mechanism is a series of processes that eventually result in the packing of lipophilic components into mixed micelles in the lumen of the intestine [1]. Mixed micelles are self-assembled structures made of bile acids, monoglycerides and fatty acids liberated from triglyceride [1]. Lipophilic drugs that are given orally need the same mechanism to be absorbed into the body. The formation of these mixed micelles is essential for absorption of these lipophilic drugs by the human body [1, 2].

The ingredients that form the mixed micelles come from bile. Bile contains bile acids, phospholipids and cholesterol. Bile acids have surfactant properties, which is essential for forming micelles. Micelles are so important, because by solubilising lipophilic molecules, they can provide a higher concentration of the lipophilic drugs in the aqueous phase before being taken up by the epithelium. Patients with cholestasis lack bile or produce bile without proper surfactant properties. Therefore those patients can only absorb lipophilic drugs and vitamins at low degree. The cholestasis causes malabsorption of lipophilic drugs and vitamins in the patients and this leads to deficiencies.

A well-known example of a cholestasis-caused deficiency is vitamin K deficiency. A deficiency of vitamin K may result in spontaneous life-threatening hemorrhages [3]. Vitamin K deficiency frequently occurs in neonates due to limited transport of vitamin K through the placental barrier and low concentration in breast milk [4]. For this reason newborns receive vitamin K prophylaxis directly after birth and during their first 3 months when they are breastfed. The formulation of the prophylaxis is vitamin K dissolved in arachis oil. For cholestatic patients it is impossible to absorb vitamin K from this formulation since they have no bile. Another formulation with vitamin K is Konakion[®] mixed micelles (MM) Paediatric, which is a formulation composed of vitamin K, egg phosphatidylcholine (EPC or lecithin) and glycocholic acid (a bile acid). It is indicated for both the prophylaxis and treatment of vitamin K deficiency bleeding in newborns as well as adults. Although Konakion[®] mixed micelles (MM) can be used for oral delivery, the uptake of vitamin K from those mixed micelles was both low and unreliable for newborns with cholestasis [5]. One of the possible reasons is that the bile salts present in the formulation have a carboxylic acid group with a pKa of 3.8, which ensures a good colloidal stability of the mixed micelles above pH > ~4 [6]. However, at low gastric pH mixed micelles are unstable and form large aggregates because of the protonation of the carboxylate group of bile salts, eventually causing coalescence of the formulation [7]. Because of the low level of endogenous bile salts in cholestatic patients, the coalesced vitamin K cannot be re-solubilized once in the intestine.

Mixed micelles have been extensively studied as an oral delivery system for lipophilic drugs such as silybin [8] streptomycin and gentamycin [9]. Besides Konakion[®] mixed micelles, several successful pharmaceutical products have been marketed as mixed micelles, like Valium MM (Diazepam) and Fungizone for infusion (Amphotericin B). These are all formulations meant for injection. Unfortunately, as discussed above, these two formulations (Valium MM (Diazepam) and Fungizone (Amphotericin B)) are unstable in the stomach and therefore not suitable for oral delivery to cholestatic patients, which may explain why they are not suggested for oral delivery in their Drug Instructions.

Concluding from these examples, lipophilic drugs can very well be packed in a delivery system like mixed micelles. Nonetheless, the current mixed micellar formulations are unsuitable for oral delivery, even

though oral delivery has been the preferred route of administration for many years. On top of that the inclusion of bile salts in the formulation has not yet proven to be helpful in the treatment of cholestatic patients.

Our group can make delivery systems based on mixed micelles that are stable for oral delivery using a new approach. This new approach is based on making the micelles stable in the gastric pH. This can be done by pegylating bile salts, which makes them more stable. Another method is using bile salts that are deprotonated by pH>2 or another method is to make mixed micelles from not two, but more different bile salts, which will make them more stable as well. Such formulations are exceptionally promising for the oral delivery of lipophilic drugs.

So far, a few formulations, which have a similar size as natural mixed micelles (nano scale) and are stable at low gastric pH, have been developed by *in vitro* testing. This testing includes the uptake and transport profile of lipophilic drugs, like vitamin K, with Caco-2 cells and organoids as a model for the intestinal epithelium. Fasted state simulated gastric or intestinal fluids (FaSSGF and FaSSIF) without bile salts are used to resemble fluids found in the gastro-intestinal (GI) tract and to mimic the pathological condition of cholestasis with Caco-2 cell as a model for *in vivo* studies [7].

This approach will be transferred to other lipophilic vitamins (A, E, D) soon. Right now we have four suitable formulations for vitamin K that will be tested. If some of these formulations show proper absorption in the rats, this project will focus further on whether this approach can be applied to other lipophilic vitamins. This leads to a maximum of 15 formulations in 5 years: we estimate two formulations for each vitamin ($3 \times 2 = 6$) and 1 formulation for a combining product containing all 4 lipophilic vitamins. That gives a total of 11 formulations. Unforeseen results could lead to retrieval of a formulation. Therefore an extra 4 formulations are added. This way 15 formulations is absolutely the maximum number of formulations that will be tested.

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?

Objective

The objective of this project is to develop new delivery systems for lipophilic drugs that are based on the naturally occurring mixed micelles but are stable at low gastric pH to deliver lipophilic drugs orally for cholestatic patients.

Formulations, that we developed, are based on different lipophilic drugs, bile salts or surfactants that meet the following requirements will be selected for further *in vivo* studies: 1. have a similar average size as natural mixed micelles (nano scale below 100 nm), 2. be stable at low gastric pH, 3. have comparable uptake efficiency and permeation to Konakion MM through Caco-2 cell monolayers and organoids from small intestine.

Feasibility

Besides the vitamin K formulation, it will be very feasible to develop new formulations for the other lipophilic vitamins as well. Our research group actually has a lot of experience in doing *in vitro* and *in vivo* research in the field of nanomedicine. Bile duct ligated rats have been used in our group before to study the bioavailability of lipophilic drugs loaded in polymeric micelles. Skilled personnel will participate in conducting procedures on animals or will acquire the necessary skills beforehand. We have access to the different instruments (UPLC, LC-MS, tissue homogenizer and IVIS Spectrum BL High-Throughput *In Vivo* Optical Imaging System) that will be needed to quantify the amount of drug from the blood or tissue samples.

3.3 Belang

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

For scientific interest:

Delivering lipophilic drugs is still an area in which researchers struggle to find suitable delivering systems. Therefore, finding new systems will give researchers an extra tool to develop new formulations with lipophilic drugs, which are not only suitable for cholestatic patients.

Societal interest:

Formulations for (lipophilic) drugs which are simple, have low production costs and are easy to administer (orally delivered) are preferred for patients. A novel delivery system containing mostly natural components which can remain stable in the stomach will have a huge market, due to the fact that natural components will be safe to administer. On top of that those formulations are urgently necessary currently especially for patients with cholestasis.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Since the objective is to develop a novel delivery system of lipophilic drugs for cholestatic patients, the strategy will be to study *in vivo*, under conditions where bile doesn't reach the intestine: absorption and intestinal uptake/transport mechanism and distribution by gaining pharmacokinetic parameters such as maximum plasma concentration (T_{max}), area under the curve (AUC) and calculating amount of drugs extracted from different parts of the intestine respectively.

Animal studies will only be done when *in vitro* models are not sufficient or already done. This means that we will only test formulations *in vivo* when they appear promising based on *in vitro* experiments, i.e. when they are stable at low pH and upon exposure to fasted state simulated gastric or intestinal fluids (FaSSGF and FaSSIF), and show efficient cellular uptake and transport studied with a Caco-2 cell model.

So, after testing formulations *in vitro*, promising formulations will be tested on pharmacokinetic parameters and on distribution of the particles.

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. Influence of newly developed delivery systems on the absorption of orally administered lipophilic drugs.

The objective of this type of experiment is to determine the pharmacokinetic profile of a new formulation under conditions with and without endogenous bile in the intestine. Rats will therefore be divided in two groups and will be randomly assigned to undergo either bile duct cannulation or a sham operation. Every rat will also receive jugular vein cannula to facilitate blood sample drawing.

Administration of the formulation will take place a day after surgery. Subsequently, blood samples will be taken at different time points.

To calculate the bioavailability and compare with previous data from transport studies pharmacokinetic parameters like, amongst others T_{max} and AUC, will be determined.

This type of animal experiment will further be called pharmacokinetics study. During the project duration different delivery systems and different API's will be tested.

2. Distribution of the new delivery system and of the drug alone in the intestine.

The objective of this type of experiment is to determine the distribution of the new delivery systems and compare this to the distribution profile of the API.

To be able to 'see' a new delivery system like mixed micelles, mixed micelles will be labelled with a fluorescent probe, which can be used as tracing indicator. The distribution of the fluorescent probes can be seen using the IVIS Spectrum BL High-Throughput *In Vivo* Optical Imaging System.

The fluorescently labelled formulation will be administered orally to fasted rats. In order to locate the

exact position of mixed micelles in the entire GI tract, four hours after administration of the drug the animals will be euthanized. The GI tract is dissected into segments and observed using the IVIS imaging system. The fluorescence intensity in each GI segment is quantified and compared [10]. At the same time, to quantify the amount of absorbed lipophilic drug, the segments will be suspended in phosphate buffered saline and rapidly stored at -80 °C until analysis [11]. This type of experiment will further be called distribution study.

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.

After administrating a new formulation, the plasma-drug-concentration-time profile will be used to evaluate the bioavailability of different formulations. Besides the bioavailability, the main absorption site in the small intestine for drug loaded mixed micelles is also quite important to understand the mechanism of absorption. Both fluorescently labeled mixed micelles and vitamin K are determined in different parts of small intestine to confirm the major absorption site.

The coherence between these two types of experiments is that both experiments give information about kinetics and degree of absorption as well as the absorption site respectively for the lipophilic drug to be investigated. On top of that the distribution study can give an explanation for differences seen in the pharmacokinetics study. Information from both studies can be used to either optimize the formulation or further develop the formulation to eventually be used in human newborns.

Phasing the experiments is not quite applicable since both experiments will be conducted to give information about the same new formulation. However, it is practical to start with the pharmacokinetics study. In case the pharmacokinetic characteristics of a new formulation appear to be inappropriate and do not result in absorption at all, it is unnecessary to conduct the distribution study.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Pharmacokinetics study
2	Distribution study
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



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	Nieuwe medicijnen met vetoplosbare geneesmiddelen voor cholestatische patiënten
1.2 Looptijd van het project	5 jaar
1.3 Trefwoorden (maximaal 5)	Cholestase, galzouten, gemengde micellen, pasgeborenen, vetoplosbare geneesmiddelen

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>Steeds meer werkzame stoffen (WS) van een medicijn zijn slecht wateroplosbaar en juist goed oplosbaar in vet. Dit remt de opname van dat medicijn vanuit het maagdarmkanaal. Het lichaam heeft voor het opnemen van vetoplosbare WS galzouten nodig. Galzouten vormen gemengde micellen (een soort minuscule bolvormige pakketjes) met de WS waardoor de stof kan worden opgenomen.</p> <p>Patiënten met cholestase produceren geen gal en kunnen daardoor vetoplosbare WS niet of nauwelijks opnemen. Om deze reden hebben die patiënten ook problemen met de opname van vetoplosbare vitamines, zoals vitamine K. Tekorten van vitamines kunnen leiden tot allerlei ziekten. Bijvoorbeeld bij pasgeboren baby's kan een gebrek aan vitamine K leiden tot ernstige stollingsproblemen, leidend tot onverwachte en vaak dodelijke</p>
---	--

hersensbloedingen.

Cholestatische patiënten kunnen geholpen worden door een nieuw medicijn te maken waarbij de vetoplosbare WS worden 'verpakt' in galzouten. Een van de uitdagingen in ons onderzoek is het vinden van geneesmiddelsamenstellingen die stabiel zijn in de maag. De doelstelling van dit project is het ontwikkelen van zulk soort nieuwe medicijnen. De doelgroep van dit project zijn cholestatische patiënten. De nieuwe medicijnen zijn bij voorkeur gemakkelijk toe te dienen (ook bij baby's) en bestaan vooral uit natuurlijke en semi-natuurlijke componenten. Met het gebruik van natuurlijke en semi-natuurlijke componenten wordt geprobeerd een zo veilig mogelijk product te maken.

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

Er zullen een aantal nieuwe medicijnen ontwikkeld worden met vetoplosbare WS. Eén daarvan zal in ieder geval een medicijn zijn met vitamine K voor baby's waarbij de gal niet in de darm terecht komt. Resultaten van dit project kunnen worden toegepast op andere slecht-wateroplosbare essentiële (voedings)stoffen en geneesmiddelen, ook voor volwassenen.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

Er zullen maximaal 1455 ratten gebruikt worden in 5 jaar.

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

De noodzakelijke operatie aan de proefdieren zal onder algehele anesthesie worden uitgevoerd, met pijnstilling na afloop. Desalniettemin valt te verwachten dat de dieren enige last en stress zullen ondervinden bij het ondergaan van de operatie en het via de mond toedienen van de medicijnen met een sonde.

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

Vrijwel alle dieren zullen in de categorie 'matig' ongemak vallen. In het ernstigste geval zou ongeveer 20% van de dieren kunnen lijden aan ernstig ongemak.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

Een deel van de ratten wordt na afloop gedood om de WS te kunnen opsporen in de darm. Het andere deel zal na afloop ook gedood worden, omdat de omleiding van de galgang niet hersteld kan worden.

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.

De gekweekte darmcellen zijn geen volledige vervanging voor een darm, want de cellen kunnen de slecht wateroplosbare WS niet afgeven aan bloed of lymfe. Daarbij maken deze cellen geen slijmvlieslaag. De slijmvlieslaag zorgt ervoor dat opname anders kan verlopen.

4.2 **Vermindering**
Leg uit hoe kan worden verzekerd dat een zo gering mogelijk aantal

Uitsluitend zullen medicijnen gebruikt worden die al uitgebreid en positief in de laboratoriumfase getest zijn op hun stabiliteit onder condities die heersen in de maag en darm; aangetoond onschadelijk zijn voor gekweekte darmcellen; en daarin opname en transport vertonen.

dieren wordt gebruikt.

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.

Er is gekozen voor ratten, omdat er veel kennis en expertise is met het werken met deze dieren. Daarnaast zijn er in literatuur al eerder modellen beschreven waarbij de galgang van ratten wordt omgeleid, waarbij binnen het vakgebied dit diermodel als meest geschikt wordt geacht voor de beoogde toepassing.

Er is gekozen voor het omleiden en niet het afbinden van de galgang, omdat afbinden voor meer ongemak zal leiden. Ratten hebben geen galblaas en daardoor zal afbinden sneller leiden tot ongemakken en ziektes zoals geelzucht.

Tenslotte, er zal een canule aangelegd worden in een ader, zodat verschillende bloedafnames gemakkelijk, zonder stress en pijnloos, gedaan kunnen worden.

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

Alle operaties worden onder volledige verdoving uitgevoerd; na de operatie wordt pijnstilling gegeven en zo nodig herhaald en de dieren zullen na de operatie en tijdens het experiment nauwkeurig worden gemonitord.

De dieren zullen moeten vasten, maar de duur hiervan zal zo kort mogelijk gehouden worden.

Indien dieren tekenen van ernstig ongerief (bijv. ernstige bloedingen) zullen vertonen, zullen ze worden gedood.

5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



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	Pharmacokinetics study

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.

The objective of this type of experiment is to determine the pharmacokinetic profile of a new formulation under conditions with and without endogenous bile in the intestine. Therefore, animals need to be a model for patients where bile doesn't reach the intestine.

The animals will be divided randomly into two groups: a group receiving bile duct cannulation and a group receiving a sham operation instead. Both groups will be divided into three groups again (control vs two new formulations based on different lipophilic drugs, bile salts or surfactants). The sham operation group will serve as the control group.

The formulation will be given intragastrically to the animals and blood samples will be drawn at different time points.

Subsequently, the rats will be euthanized. Blood samples will be analysed by a previously validated method of analysis and pharmacokinetic parameters, like maximum plasma concentration (T_{max}) and area under the curve (AUC), will be calculated. Those pharmacokinetic parameters are the primary outcome parameters.

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.

Animals will start by having surgery with isoflurane anaesthesia (including adequate analgesia):

- Receiving bile duct cannulation or a sham operation as a control group. The sham operation consists of the same procedure, however without the cannula being placed.
- Receiving jugular vein cannulation.

The bile duct cannulation will be done by making an incision below the ribcage. The bile duct will be located, isolated and cannulated. The cannula will be tunnelled to the back of neck to allow the bile to drip out of the animal [12]. The cannula will be sufficiently long enough to enable collecting the bile out of the cage. In the

2-day period between operation and experiment, the residue of bile in the intestine will be absorbed sufficiently by the intestine and therefore the influence of endogenous bile on the absorption of lipophilic drugs is absent.

The sham operation consists of the same procedure, however without the cannula being placed.

For the jugular vein cannula an incision in the neck of the animal will be made through which the jugular vein can be located, isolated and cannulated. The cannula will be tunneled to the back of the neck. Cannulas will be filled and flushed with 10 IU/ml heparin in saline to maintain cannula patency.

Animals will rest and recover for 2 days with free access to food in a normal cage with sawdust. And post-operative analgesia (pain killer) will be provided.

After recovery the animals will be brought back to the standard animal rooms and fasted over night before intragastrical administration of the new medicine by using a gavage. The small intestines will be emptied from food during this period of fastening and influence of diet will thereby be minimised.

After treatment blood samples (max 8 ml / kg in total) will be drawn at different time points from the jugular vein cannula with minimal discomfort for the animal.

Bile duct cannulation (and not ligation) is chosen since this has the least impact on the animal: if a rat will be ligated, the bile can't flow away. Due to the fact that rats do not have a gallbladder, the bile will build up directly in the liver. This will make the rats uncomfortable and may possibly lead to diseases like jaundice. By putting a cannula in the bile duct the bile will freely drop away outside of the animal, leading to less discomfort for the animal. Another advantage of cannulation is that it will be possible to collect the bile and use this in *in vitro* experiments.

Since all animals need to receive surgery anyway to turn into a model where bile doesn't reach the intestine, it is decided to add a jugular vein cannula as well. This way there is no extra discomfort for the animal and frequent blood sampling will barely lead to discomfort for the animal.

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

In this type of experiment mixed micelles are tested on their absorption profile; outcome parameters are blood concentrations over time (C_{max} , area under the curve (AUC), $t_{1/2}$).

The group size is calculated using Lehr's formula based on data from pilot studies done in the past (standardized difference of 2 and SD of 1,3975), a power of 80% and a two-sided significance level of 0,05. This leads to a group size of 6-8 animals.

B. De dieren

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

Mature rats (6-8 weeks, 250g \pm 25g) bred in Europe and of commercial origin will be used. Both male and female rats can be used. Rats are selected because they are the most widely used animals in biomedical research. Second of all, rats are the smallest animals by whom it will be possible to cannulate their bile ducts. Thirdly, rats with bile duct cannulation have often been used as a model where bile doesn't reach the intestine [12].

Number of animals

Experiments will be set up in a way to compare one or multiple new formulations with a control (a glycocholic acid/egg phospholipid based formulation that is already on the market). In one experiment, on average two new formulations will be compared to a control ($3 \times 8 = 24$ animals). All new formulations based on different lipophilic vitamins (A, E, D and K) and will be tested in cannulated and non-cannulated animals (sham operation) ($24 \times 2 = 48$ animals). Unexpected loss of animals can be caused by surgical trauma. 5 animals will be used in a training and a pilot study first to gain the necessary skills for personnel to avoid excessive loss of animals. After training loss of animals is estimated on 20% ($120\% \times 48 = 58$ animals (+5 for training)). This type of experiment will be done approximately 3 times a year ($58 \times 3 = 174$ animals (+5 for training)) considering repetition of the same vitamin. This leads to an estimation of $174 \times 5 = 870 + 5$ animals for training is 875 animals in total that will be needed for this type of experiment for the entire project duration of 5 years (maximum of 15 new formulations).

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.

Replacement

In vitro experiments will be done as much as possible. Unfortunately, the currently existing cell models can't give reliable data about absorption and permeation of highly fat soluble medicines or bile acids. This is because a cell model is an emasculated model for reality, missing features like a mucus layer and lymph and unable to form and secrete the vitamin K normally.

Reduction

The delivery systems will be tested *in vitro* and *ex vivo models* (organoids) first to allow a further screening and therefore to possibly use fewer animals. Also, the pilot study has been done to properly calculate an adequate sample size.

Personnel will be trained first to gain the necessary skills to avoid more loss of animals, making it possible to have smaller group sizes and still a sufficient power. This all leads to the reduction of the animals.

Refinement

The rat is chosen as the model because there is extensive knowledge and expertise in this species. There are a large number of bile duct cannulation models available for rats.

By cannulating instead of ligating the bile duct the model is more refined leading to less discomfort for the animals. Also, giving the animals a jugular vein cannula since the rats are under anesthesia anyway, refines the model. Last of all, giving the animals harmless drugs, like vitamin K, will refine the model, since there will barely be side effects. The total approach will prevent the animals from suffering from unnecessary pain or discomfort.

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.

Untill surgery rats will be housed in groups and have access to nesting material and *ad libitum* food and water.

To give the rats a jugular vein cannula reduces the pain and stress of drawing blood samples. Also by giving harmless active pharmaceutical components, like vitamin K, nor harmless excipients (semi-natural and natural compounds), rats will have no harmful effects of the ingredient. This will prevent them from a lot of unnecessary pain or discomfort.

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.

Not applicable

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.

The animals will be housed individually after surgery. However, they will be housed in the same room so they can still see, hear and smell each other.

After surgery the animals will have, amongst others, the jugular vein cannula sticking out of their neck. The cannula will be led through a tube attached to a jacket, but not every part of the cannula will be hidden, meaning rats could chew on each other's cannula. If the cannula is broken, rats will bleed to death. Thus, for their own safety, rats must be housed alone after surgery.

Also rats have the bile duct cannula sticking out of their neck. This cannula will be led out of the cage via the jacket to be able to collect the bile. However, if rats would be housed in one cage, chewing on the cannula could lead to rats licking each other's cannula, which would have a negative impact on the experiment. Therefore it is necessary to house the rats solitarily after surgery.

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.

Postoperative analgesics will be applied in consultation with a veterinarian from the laboratory animal facility.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Solitary housing is absolutely necessary due to cannulations and to prevent bile uptake. Animals will be fasted over night before intragastrical administration of the new medicine by using a gavage the next day.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

After surgery the animals will have, amongst others, the jugular vein cannula sticking out of their neck. The cannula will be led through a tube attached to a jacket, but not every part of the cannula will be hidden, meaning rats could chew on each other's cannula. If the cannula is broken, rats will bleed to death. Thus, for their own safety, rats must be housed alone after surgery.

Also rats have the bile duct cannula sticking out of their neck. This cannula will be led out of the cage via the jacket to be able to collect the bile. However, if rats would be housed in one cage, chewing on the cannula could lead to rats licking each other's cannula, which would have a negative impact on the experiment. Therefore it is necessary to house the rats solitarily after surgery. Since oral medicines will be tested, it will be necessary to keep the number of influences on the results to a minimum. When animals can eat, the food adds a huge variability to the experiments. Therefore, it will be needed to fasten the rats (12 hours maximum).

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

The period for fasting the rats after recovery will be kept as short as possible (maximum of 12 hours), so the discomfort of solitarily housing and fasting for the animals is as low as possible. Rats will be fasted overnight (8 hours) and are allowed to eat four hours after administration of the formulations. Four hours of fasting after administration will be enough to let the formulation be absorbed as was indicated by the pilot study.

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.

Loss of animals is expected to be 20% after training. Animals can be lost during surgery as well as after surgery. During surgery animals can be lost, for example because of too much blood loss. After surgery humane endpoints should be applied when animals have a clogged cannula (either bile or jugular vein), an infection in the wound or when an animal clearly shows unusual behaviour.

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

The estimation is that 20% of all animals will reach one of the above mentioned criteria.

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.

The cumulative discomfort classification will be set on 'matig'. The surgery requires full anaesthesia. This is moderate discomfort. When an animal drops out, this can be caused by 'severe' inconvenience. All the other things that will be done to the animals can be classified as 'light'.

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.

When animals have received bile duct cannulation, they won't be able to properly absorb their food after the experiment, because bile can't reach the intestines anymore.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--------------------|
| 2 | Distribution study |

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.

The objective of this experiment is to determine the main absorption site of the lipophilic drug and the distribution of the new delivery systems in the small intestine. This will be achieved by use of fluorescently labelled mixed micelles.

The animals will be divided into two groups: a group receiving bile duct cannulation and a group receiving a sham operation instead. Both groups will be divided into two groups again (control vs a new formulation based on different lipophilic drugs, bile salts or surfactants). The sham operation group will serve as the control group.

Rats are given an intragastrical administration of a fluorescently labelled new formulation based on different lipophilic drugs, bile salts or surfactants or a fluorescently labelled control group.

Four hours after administration the animal will be euthanized and immediately dissected to harvest the entire intestine. This will be segmented. All individual segments will be observed under the IVIS Imaging System, which shows the fluorescently labeled formulations, after which the segments will be rapidly stored at -80 °C until further quantitative analysis of lipophilic drugs extracted from above segments.

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.

Animals will start by having surgery with isoflurane anaesthesia (including adequate analgesia):

Receiving bile duct cannulation or a sham operation. The sham operation consists of the same procedure, however without the cannula being placed.

The bile duct cannulation will be done by making an incision below the ribcage. The bile duct will be located, isolated and cannulated. The cannula will be tunnelled to the back of neck to allow the bile to drip out of the

animal [12]. The cannula will be sufficiently long enough to enable collecting the bile out of the cage. The residue of bile in the intestine will be absorbed sufficiently by the intestine and therefore the influence of endogenous bile on the absorption of lipophilic drugs is limited.

The sham operation consists of the same procedure, however without the cannula being placed.

Animals will rest and recover for 2 days with free access to food in a normal cage with sawdust. And post-operative analgesia (pain killer) will be provided.

After recovery the animals will be brought back to the standard animal rooms and fasted over night before intragastrical administration of the new medicine by using a gavage. The small intestines will be emptied from food during the fastening and influence of diet will be minimised.

In order to clearly locate the position of mixed micelles in the entire intestine, rats will be euthanized 4 hours after administration of the new formulation.

Bile duct cannulation (and not ligation) is chosen since this has the least impact on the animal: if a rat will be ligated, the bile can't flow away. Because rats don't have a gallbladder, the bile will build up directly in the liver. This will make the rats uncomfortable and may possibly lead to diseases like jaundice. By putting a cannula the bile will freely drop away on the outside of the animal, leading to less discomfort for the animal. On top of this, it will also be possible to collect the bile and use this in *in vitro* experiments.

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

In this type of experiment the outcome will be the intensity of fluorescently labelled micelles in the different parts of the intestine.

The group size is calculated using Lehr's formula based on data from literature: a standardized effect of 0,05, a standard deviation of 0,0225 [11], a power of 80% and a two-sided significance level of 0,05. This leads to a group size of 6-8 animals.

B. De dieren

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

Mature rats (6-8 weeks, 250g ± 25g) bred in Europe and of commercial origin will be used. Both male and female rats can be used. Rats are selected because they are the most widely used animals in biomedical research. Second of all, rats are the smallest animals by whom it will be possible to cannulate their bile ducts. Thirdly, rats with bile duct cannulation have often been used as a model where bile doesn't reach the intestine [12].

Number of animals

Experiments will be set up in a way to compare two new formulations with a control group (a glycocholic acid/egg phospholipid based formulation that is already on the market as a control, 8x3=24 animals). Maximum of 5 new formulations based on different lipophilic vitamins (A, E, D and K) will be tested in cannulated and non-cannulated animals (sham operation) (24x2=48 animals). Unexpected loss of animals can be caused by surgical trauma. 5 animals will be used in a training first to gain the necessary skills for personnel to avoid more loss of animals. Those 5 animals are the same as discussed in attachment 1. After training loss of animals is estimated on 20% (20%x48=10 animals). This type of experiment will be done approximately 2 times a year ((48+10)x2=116 animals) considering the repetition of the same formulation. This leads to an estimation of 116x5=580 animals in total that will be needed for this type of experiment for the entire project duration of 5 years.

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.

Replacement

In vitro experiments will be done as much as possible. Unfortunately, *in vitro* experiments can tell us nothing about the distribution of particles through the entire intestinal tract. *In vitro* models can tell something about parts of the intestine, but *in vitro* models do not show the entire GI-tract. For this reason, distribution studies can not be done in *in vitro* models.

Reduction

The delivery systems will be tested *in vitro* and *ex vivo models* (organoids) first to allow a further screening and therefore to possibly use fewer animals.

Personnel will be trained first to gain the necessary skills to avoid more loss of animals, making it possible to have smaller group sizes and still a sufficient power.

Lastly, in case the pharmacokinetics study of a new formulation does not demonstrate absorption, a distribution study will not be conducted. This all leads to the reduction of the animals.

Refinement

The rat is chosen as the model because there is extensive knowledge and expertise in this species. There are a large number of bile duct cannulation models available for rats.

By cannulating instead of ligating the bile duct the model is more refined leading to less discomfort for the animals. Last of all, giving the animals harmless drugs, like vitamin K, will refine the model, since there will barely be side effects. The total approach will prevent the animals from suffering from unnecessary pain or discomfort.

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.

Until surgery rats will be housed in groups and have access to nesting material and *ad libitum* food and water.

Also by giving harmless active pharmaceutical components, like vitamin K, nor harmless excipients (semi-natural and natural compounds) rats will have no harmful effects of the ingredient. This will prevent them from a lot of unnecessary pain or discomfort.

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.

Not applicable

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.

The animals will be housed individually after surgery. However, they will be housed in the same room so they can still see, hear and smell each other.

After surgery the rats will have the bile duct cannula sticking out of their neck. The cannula will be led

through a tube attached to a jacket, but not every part of the cannula will be hidden, meaning rats could chew on each other's cannula. This cannula will be led out of the cage via the jacket to be able to collect the bile. However, if rats would be housed in one cage, chewing on the cannula could lead to rats licking each other's cannula, which would have a negative impact on the experiment. Therefore, it is necessary to house the rats solitarily after surgery.

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.

Postoperative analgesics will be applied in consultation with a veterinarian from the laboratory animal facility.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Solitary housing is absolutely necessary due to cannulations and to prevent bile uptake. Animals will be fasted over night before intragastrical administration of the new medicine by using a gavage the next day.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Rats have the bile duct cannula sticking out of their neck with bile being collected outside of the cage. When multiple animals are housed in 1 cage, it would be possible for the rats to chew each other's bile duct cannula and lick the bile, leading to a failed experiment. Therefore solitarily housing is absolutely necessary.

Distribution can be completely different when food or digesting food is present in the GI-tract. To be able to keep the variability low, animals need to have no food in their tracts. Therefore, it will be needed to fasten the rats.

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

The period for fasting the rats after recovery will be kept as short as possible (overnight, maximum of 12 hours), so the discomfort of solitarily housing and fasting for the animals is as low as possible.

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.

Loss of animals is expected to be 20% after training. Animals can be lost during surgery as well as after surgery. During surgery animals can be lost, for example because of too much blood loss. After surgery humane endpoints should be applied when animals have a clogged cannula (either bile or jugular vein), an infection in the wound or when an animal clearly shows unusual behaviour.

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

The estimation is that 20% of all animals will reach one of the above mentioned criteria.

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.

The cumulative discomfort classification will be set on 'matig'. The surgery requires full anaesthesia. This is moderate discomfort. When an animal drops out, this can be caused by 'severe' inconvenience. All the other things that will be done to the animals can be classified as 'light'.

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.

The experiment involves dissecting the animals to be able to investigate the distribution of the particles in the intestines. Euthanizing the animals is absolutely necessary for this reason.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2016.I.861.012
2. Titel van het project : Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients
3. Titel van de NTS : Nieuwe medicijnen met vetoplosbare geneesmiddelen voor cholestatische patiënten

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: 25-11-2016
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 07-12-2016
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 12-12-2016/13-12-2016
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 19-01-2017

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: 12-12-2016
- Datum antwoord: 13-12-2016
- Gestelde vragen en antwoorden:

Niet Technische Samenvatting

- 3.1 Beschrijving doelstellingen: U schrijft hier: *"De doelstelling van dit project is het ontwikkelen van zulk soort nieuwe medicijnen. De doelgroep van dit project zijn cholestatische baby's. De nieuwe medicijnen zijn daarom gemakkelijk toe te dienen en bestaan vooral uit natuurlijke en semi-natuurlijke componenten, waardoor ze veilig zijn"*. Als de DEC het goed begrepen heeft zijn cholestatische baby's niet de doelgroep. Al zouden baby's wel de doelgroep zijn, dan nog is het niet zo dat de beoogde formuleringen *daarom* gemakkelijk toe te dienen zijn. Ook klopt het niet dat de medicijnen die uit natuurlijke of semi-natuurlijke componenten bestaan om die reden als veilig kunnen worden beschouwd. De logica van deze passage ontgaat de DEC dan ook volledig. De DEC raadt u aan dit beter te formuleren.
Dit stuk tekst is aangepast naar: "De doelgroep van dit project zijn cholestatische patiënten. De nieuwe medicijnen zijn bij voorkeur gemakkelijk toe te dienen (ook bij baby's) en bestaan vooral uit natuurlijke en semi-natuurlijke componenten. Met het gebruik van natuurlijke en semi-natuurlijke componenten wordt geprobeerd een zo veilig mogelijk product te maken."
- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijk en/of maatschappelijk belang: U schrijft hier: *"Eén daarvan zal in ieder geval een medicijn zijn met vitamine K voor baby's die geen gal kunnen produceren"*. Dit zou eigenlijk moeten zijn: ...voor baby's waarbij de gal niet in de darm terecht komt.
Dit is aangepast is aangepast in de gesuggereerde tekst.
- 3.5 Indeling dierproeven naar de verwachte ernst: Hier zegt u: *"Ongeveer 20% van de dieren zou kunnen doodgaan door ernstig ongemak"*. Door deze formulering lijkt het alsof 20% van de dieren het humaan eindpunt bereikt, terwijl dat niet bedoeld wordt. De DEC raadt u aan dit anders te formuleren.
Het is geherformuleerd in: "In het ernstigste geval zou ongeveer 20% van de dieren kunnen lijden aan ernstig ongemak."

Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: Het gebruik van de benaming *model voor cholestase* wekt de verkeerde indruk, omdat het hier niet gaat om een diermodel voor cholestase waarin een therapie voor cholestase getest zal worden. Daar richt dit project zich helemaal niet op. Wellicht is het beter om te spreken over een model waarbij geen gal in de darm komt.
Ik meen dat we in het projectvoorstel niet de term 'model voor cholestase' hebben gebruikt. Dit hebben we wel in andere documenten gebruikt. Daar is het dan ook aangepast. We hebben het in het stuk tekst projectvoorstel 3.1 achtergrond wel over cholestatische patiënten en cholestatische condities. Bij patiënten heb ik het laten staan, omdat het daadwerkelijk gaat over patiënten die cholestase hebben. Waar condities staat heb ik het aangepast in condities waarbij gal de darm niet bereikt. Hopelijk heb ik uw opmerking zo goed begrepen.

- 3.1 Achtergrond: De DEC vraagt zich af waarom er 15 nieuwe formuleringen getest worden. De argumentatie daarvoor dient te worden opgenomen in het projectvoorstel. Indien hier een wetenschappelijke overweging achter zit, dan deze graag vermelden. *We hebben gekozen voor 15 formuleringen op basis van een schatting. De opbouw van deze schatting is nu beschreven in het projectvoorstel.*
- 3.1 Achtergrond: U schrijft in de aanvraag: *"Our group can make delivery systems based on mixed micelles that are stable for oral delivery using a new approach"*. Wat bedoeld u met *new approach*? Kunt u een tipje van de sluier oplichten? Het belang van de aanvraag hangt immers sterk af van de vraag hoe kansrijk deze nieuwe benadering is. *Er is een toelichting gegeven over welke manieren wij de 'new approach' zien. Hopelijk is deze toelichting voldoende voor u om een beoordeling te doen.*
- 3.1 Achtergrond: Er wordt gerefereerd naar resultaten van pilotstudies. De DEC verzoekt u in de aanvraag duidelijk te vermelden dat dit om pilotstudies uit het verleden gaat (waarvoor u dus nu geen vergunning vraagt). De huidige formulering werkt wat verwarrend. *Ik geloof dat we in de het projectvoorstel niet verwijzen naar de pilotstudie. In de bijlage wel. Daarom is dit hier verduidelijkt.*

Bijlage 1

- Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: In de aanvraag staat: *"Rats will be fastened (fasted, neemt de DEC aan?) overnight and are allowed to eat four hours after administration of the formulations"*. Waarschijnlijk bedoelt de u hier "gedurende vier uur na toediening" en niet "vier uur na toediening". Graag verhelderen. *Het gaat hier inderdaad om 'fasted'. Dit is om die reden aangepast. Het is de bedoeling dat de ratten gedurende 4 uur na toediening van het geneesmiddel nog worden gevestig. Dit geeft het geneesmiddel de tijd om opgenomen te kunnen worden. Daarna mag de rat weer eten zonder dat dat invloed zal hebben op de opname van het geneesmiddel. Er wordt dus 8 uur voor het toedienen gestart met vasten.*

Bijlage 2

- B. De dieren: Het is de DEC niet duidelijk waarom hier maar 1 nieuwe formulering en in vorige bijlage 2 nieuwe formuleringen worden getest. Graag verhelderen. *Dit is aangepast naar 2 formuleringen.*
- H. Pijn en pijnbestrijding: U heeft hier nee aangevinkt in plaats van ja. Dit is niet correct. Graag wijzigen. *Dit is 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.

Steeds meer nieuwe geneesmiddelen bevatten lipofiele (vetoplosbare) componenten, welke nauwelijks oplosbaar zijn in water. Bij orale toediening beperkt dit de biologische beschikbaarheid van deze componenten, aangezien ze moeten worden opgelost in de vloeistoffen van het darmlumen. Het lichaam heeft een mechanisme ontwikkeld om de lipofiele componenten te kunnen absorberen. Dit mechanisme bestaat uit een reeks processen die uiteindelijk leiden tot het verpakken van lipofiele componenten in gemengde micellen in het lumen van de darm. Gemengde micellen bestaan uit een samenvoeging van galzuren, monoglyceriden en vetzuren. De vorming van deze gemengde micellen is dus essentieel voor de absorptie van geneesmiddelen met lipofiele componenten door het menselijk lichaam. Mensen met een cholestase produceren geen gal, waardoor geen gemengde micellen gevormd kunnen worden en de lipofiele componenten uit een medicijn niet goed kunnen worden opgenomen door het maagdarmkanaal. Ook vet oplosbare vitamines, zoals vitamine K, zijn door een gebrek aan galzuren moeilijk op te nemen door het lichaam. Tekorten aan vitamines kunnen leiden tot allerlei ziekten. Bij baby's kan een tekort aan, bijvoorbeeld, vitamine K leiden tot ernstige stollingsproblemen, wat vervolgens kan leiden tot hersenbloedingen. Met behulp van het voorliggende project wil de aanvrager daarom in ratten onderzoeken of een nieuw afgiftesysteem voor medicijnen ontwikkeld kan worden waarbij de medicijnen verpakt worden in van nature voorkomende micellen. De uitdaging daarbij is om een *formule* te vinden die ook stabiel is in de maag.

Het project is opgedeeld in een tweetal fasen, te weten een farmacokinetiekstudie (bijlage 1) en een distributiestudie (bijlage 2). In de eerste bijlage zal de farmacokinetiek van nieuwe formules bepaald worden met en zonder endogene gal in de darm. Hiervoor wordt een ratmodel gebruikt, waarbij de gal niet in de darm terecht komt. Het doel van bijlage 2 is het bepalen van de belangrijkste absorptieplaats van lipofiele geneesmiddelen en het bepalen van de verdeling van de nieuwe afgiftesystemen in de dunne darm. Daarnaast kan de distributiestudie een verklaring geven voor de verschillen die eventueel gezien zullen worden in de farmacokinetiekstudie. Informatie uit beide studies kan worden gebruikt voor de optimalisering of de verdere ontwikkeling van de formulering. De relatie tussen het hoofddoel en de subdoelen

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

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

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is het ontwikkelen van een nieuw afgiftesysteem voor lipofiele geneesmiddelen, gebaseerd op de van nature voorkomende micellen, die stabiel zijn bij een lage pH-waarde in de maag. Het uiteindelijke doel van het project is om geneesmiddelen met lipofiele componenten effectief te laten zijn bij orale toediening aan cholestatische patiënten. Het betreft een fundamenteel en translationeel onderzoek. De DEC acht vertaling van de resultaten naar de mens mogelijk. 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: proefdieren, cholestatische patiënten en de onderzoekers. Zoals bij C1 vermeld, is het voor mensen met cholestase niet of nauwelijks mogelijk om lipofiele componenten uit medicijnen op te nemen vanwege het ontbreken van gal. Door een afgiftesysteem te ontwikkelen, waarbij de vet oplosbare componenten worden 'verpakt' in galzouten kunnen cholestase patiënten medicijnen eenvoudiger toegediend krijgen.

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

Voor de onderzoekers geldt dat het ontwikkelen van deze nieuwe techniek bijdraagt aan een goede wetenschappelijke reputatie. Wetenschappelijke status kan door de onderzoeker van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC Utrecht geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren.

6. Er is geen sprake van substantiële milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De onderzoeksgroep heeft veel ervaring met *in vitro* en *in vivo* onderzoek op het gebied van nanomedicijnen. De DEC is er daarom van overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. De DEC is er bovendien van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project zal kunnen 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. Voorafgaand aan het project zullen afgiftesystemen *in vitro* onderzocht worden. Alleen wanneer de *in vitro* modellen veelbelovende resultaten opleveren, zullen nieuwe formules *in vivo* getest worden. In de eerste fase (bijlage 1) zal de farmacokinetiek van het nieuwe afgiftesysteem bepaald worden met en zonder endogene gal in de darm. Hiervoor wordt een ratmodel gebruikt, waarbij de gal niet in de darm terecht komt. De dieren zullen random verdeeld worden over twee groepen, waarbij één groep onder anesthesie een galgang canule krijgt aangebracht en de andere groep een shamoperatie ondergaat. Bij alle dieren zal een canule in de halsslagader worden aangebracht om bloed af te nemen. Nadat de dieren hersteld zijn zullen zij een nacht gevast worden, waarna de nieuwe formule middels orale gavage wordt toegediend. Het vasten is nodig om de variatie, veroorzaakt door voeding, te beperken. Vervolgens zal op diverse tijdstippen bloed worden afgenomen. Om de biologische beschikbaarheid te bepalen en om de uitkomsten te vergelijken met voorgaande distributiestudies, zullen de maximale plasmaconcentratie (Tmax) en de 'Area Under the Curve' (AUC) de primaire uitkomstparameters zijn.

Net als in bijlage 1 zal bij de dieren in bijlage 2 onder anesthesie, al dan niet, een galgangcanule worden geïmplant. Om de absorptieplaats en de verdeling van de formule in de dunne darm te bepalen, zullen de gemengde micellen gelabeld worden met een fluorescent middel. Met behulp van imaging kunnen de micellen gevolgd worden. Voordat de gelabelde micellen oraal worden toegediend, worden de dieren voor een nacht gevast. Vier uur na toediening van de formule worden de dieren gedood om de positie van de gemengde micellen in de organen exact te lokaliseren.

De DEC is van mening dat het project goed doordacht is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstellingen, het te gebruiken diermodel goed beargumenteerd is binnen het kader van de vraagstelling en dat verwacht mag worden dat de doelstellingen van het project behaald zullen worden.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I 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. Tijdens de chirurgische ingreep zullen de dieren een canule in de halsslagader en eventueel een galgang canule geïmplanteerd krijgen, welke beiden uit de nek van de rat zullen steken. Andere ratten kunnen daaraan gaan knagen. Wanneer de canule in de halsslagader kapot geknaagd wordt kunnen de dieren dood bloeden en wanneer de galgangcanule kapot geknaagd wordt kunnen de dieren elkaars gal binnen krijgen, wat effect kan hebben op de resultaten van de studie. Om die redenen worden ze individueel gehuisvest. De dieren zullen elkaar wel kunnen zien, horen en ruiken.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het cumulatieve ongerief is voor beide bijlagen ingeschat als matig vanwege het implanteren van de canules onder anesthesie. Het vasten, het toedienen van de formule en de euthanasie zullen licht ongerief geven.
12. De integriteit van de dieren wordt met name in gedragsmatig opzicht aangetast. Omdat deze canules niet kapot mogen gaan worden de dieren solitair gehuisvest en omdat de dunne darm vrij moet zijn van voedsel worden de dieren een nacht gevast. Door beide handelingen wordt de dieren de mogelijkheid ontnomen om bepaalde aspecten van hun natuurlijk gedrag uit te oefenen (gedragsmatige aantasting). Aan het einde van de experimenten worden de dieren gedood hetgeen als een aantasting van fysieke integriteit kan worden beschouwd.
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. Indien de dieren te veel bloed verliezen tijdens de operatie, de canule verstopt raakt, een wondinfectie optreedt of ongewoon/afwijkend gedrag vertonen, wordt een dier uit de proef gehaald. Verwacht wordt dat ca. 20% van de dieren het humane eindpunt bereikt.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Zoals bij C8 reeds vermeld, worden de *in vivo* experimenten voorafgegaan door *in vitro* experimenten. De *in vivo* experimenten zijn noodzakelijk omdat *in vitro* onderzoek met gekweekte darmcellen niet als volledige vervanging kunnen dienen voor het gehele maagdarmkanaal. De gekweekte darmcellen kunnen geen informatie geven over de absorptie en permeatie van de lipofiele geneesmiddelen of galzuren, omdat bepaalde functies in de darmcellen ontbreken zoals de slijmvlieslaag en de lymfe. Ook kunnen de *in vitro* darmcellen geen resultaten geven over de verdeling van de nieuwe afgiftesystemen in de dunne darm.

15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. De DEC is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel t.o.v. de gekozen strategie en looptijd. Doordat alleen de afgiftesystemen geselecteerd worden die bij het *in vitro* onderzoek goede resultaten laten zien, wordt voor het *in vivo* onderzoek al een eerste shifting gemaakt. Dit heeft effect op het aantal benodigde dieren. De operaties zullen worden uitgevoerd door ervaren medewerkers waardoor de operatieve uitval beperkt wordt.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Er is gekozen voor het gebruik van ratten omdat er binnen de onderzoeksgroep veel kennis en expertise is het werken met ratten. Daarnaast is er veel literatuur beschikbaar over ratmodellen waarbij de galgang gecannuleerd wordt. Voor dit specifieke model is gekozen, en niet voor een model waarbij de galgang wordt afgebonden, omdat dit model tot het minste ongerief leidt. Bij de dieren zal ook een canule worden aangebracht in de halsslagader om de verschillende bloedafnames eenvoudig, zonder stress en pijnloos te laten verlopen.
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 dieren een galgang canule geïmplanteerd krijgen, zullen ze niet meer in staat zijn om hun voedsel goed te absorberen omdat het gal de darmen niet meer kan bereiken. Daarnaast is het in bijlage 2 noodzakelijk om post mortem onderzoek te verrichten om de positie van de gemengde micellen in de organen exact te lokaliseren. 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 ontwikkelen van een nieuw afgiftesysteem voor lipofiele geneesmiddelen 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 er van dit onderzoek belangrijke nieuwe wetenschappelijke ontwikkelingen op het gebied van de 'verpakking' en opname van lipofiele geneesmiddelen verwacht mag worden. De DEC kent daar veel gewicht aan toe. Op korte termijn kunnen deze nieuwe ontwikkelingen van substantieel belang zijn voor mensen die weinig of geen gal aanmaken, waardoor lipofiele geneesmiddelen nauwelijks of niet kunnen worden opgenomen door het lichaam. Als gevolg hiervan kunnen bij deze patiënten ernstige tekorten en gebreken ontstaan. Tot nu toe zijn geen geschikte alternatieve toedieningsmethoden beschikbaar.

Indien de hierboven genoemde doelstellingen behaald worden, dan zal dit project bijdragen aan het ontwikkelen van een nieuwe afgiftemethode voor geneesmiddelen met lipofiele componenten, welke oraal en effectief toegediend kunnen worden aan cholestatische patiënten. Mensen die lijden aan cholestase, zijn er bij gebaat wanneer met behulp van dit nieuwe afgiftesysteem, lipofiele medicijnen oraal kunnen worden toegediend en hun werking niet verliezen omdat de lipofiele delen niet kunnen worden opgenomen in het darmlumen. 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 de individuele onderzoeker van belang kan zijn om aansprekende onderzoeksresultaten te boeken is juist, maar in de uiteindelijke afweging kent de DEC Utrecht daar weinig gewicht aan toe.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC Utrecht van oordeel dat het ontwikkelen van een nieuw afgiftesysteem voor lipofiele geneesmiddelen 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 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

[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
AVD108002017846

Bijlagen

2

Datum 25 januari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 24 januari 2017. Het gaat om uw project "Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002017846. 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:

25 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD108002017846

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
25 januari 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017846

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: ██████████
Afdeling: Biofarmacie, faculteit betawetenschappen
Telefoonnummer: ██████████
E-mailadres: ██████████

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Datum:

25 januari 2017

Aanvraagnummer:

AVD08002017846

Over uw project

Geplande startdatum: 1 april 2017

Geplande einddatum: 1 april 2022

Titel project: Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients

Titel niet-technische samenvatting: Nieuwe medicijnen met vetoplosbare geneesmiddelen voor cholestatiche patiënten

Naam DEC: DEC Utrecht

Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht

E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.187,-

De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagenVerplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvattingOverige bijlagen: DEC-advies**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]

Functie: [REDACTED]

Plaats: Utrecht

Datum: 24 januari 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC
Postbus 80.011
3508 TA UTRECHT


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD108002017846
Bijlagen
2

Datum 25 januari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 25 januari 2017
Vervaldatum: 24 februari 2017
Factuurnummer: 170846
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD108002017846	€ 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.

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 15 februari 2017 17:14
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: AVD108002017846:aanvullende informatie

Geachte [REDACTED]

Op 24 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients" met aanvraagnummer AVD105802017846.

Welke informatie nog nodig

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

De inschatting van het cumulatieve ongerief is niet geheel duidelijk. In de bijlagen dierproeven wordt aangegeven dat het cumulatief ongerief wordt ingeschat als matig. De DEC is ook van mening dat het cumulatieve ongerief matig is en dat dit realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Volgens u kunnen dieren die uitvallen echter ernstig ongerief ondergaan. Uit de beschrijving van de humane eindpunten en de NTS blijkt dat het gaat om maximaal 20% van de dieren. Hieruit kan opgemaakt worden dat maximaal 20% van de dieren ernstig ongerief zal ondergaan. U wordt verzocht aan te geven hoeveel dieren ernstig ongerief zullen ondergaan.

U geeft aan in bijlage 3.4.4.1. een aantal dieren te gebruiken voor training en een pilot studie. Uit de aanvraag blijkt echter niet welke pilot studie uitgevoerd gaat worden en welke keuzes n.a.v. de pilot studie gemaakt zullen worden. U wordt verzocht dit te verhelderen.

Opsturen informatie

De CCD zou uw aanvraag graag in de eerstkomende vergadering bespreken. Wij zouden het daarom op prijs stellen als u de aanvullende informatie uiterlijk donderdag 16 februari kunt aanleveren. Wij realiseren ons dat dit erg kort dag is. Mocht dit niet lukken, u heeft 14 dagen de tijd om de ontbrekende informatie op te sturen. U kunt deze informatie onder vermelding van het aanvraagnummer (AVD108002017846) aanleveren via NetFTP of per e-mail.

Wanneer een beslissing

De beslistermijn op uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat bovengenoemde informatie is ontvangen. Na ontvangst van uw reactie/de ontbrekende informatie nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

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)

[REDACTED]

Van: [REDACTED]
Verzonden: donderdag 16 februari 2017 11:45
Aan: info@zbo-ccd.nl
CC: [REDACTED]
Onderwerp: Aanvullende informatie AVD108002017846

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte leden van de CCD,

In uw email van 15 februari jongstleden vraagt u om extra informatie over het project "Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients". In deze mail geef ik u graag de gevraagde informatie.

Ernstig ongerief

Over 5 jaar zullen er maximaal 1455 ratten gebruikt worden. Twintig procent komt neer op ongeveer 291 ratten. Die zouden kunnen lijden aan ernstig ongerief. Wij verwachten door middel van training dit percentage zo laag mogelijk te houden en daarom kan deze hoeveelheid gezien worden als een maximum aantal ratten dat ernstig ongerief zal ondergaan.

Training en pilot studie

De pilot studie waarnaar wordt verwezen in de aanvraag is een studie die reeds is uitgevoerd in Melbourne, Australië (november 2015). Deze pilot studie valt daarom niet binnen het bereik van de huidige aanvraag. Echter, data van die studie zijn wel gebruikt om een degelijke groeps grootte te berekenen.

Ik hoop u met deze email van voldoende informatie te hebben voorzien.

Hartelijke groet,
[REDACTED]



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	Pharmacokinetics study

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.

The objective of this type of experiment is to determine the pharmacokinetic profile of a new formulation under conditions with and without endogenous bile in the intestine. Therefore, animals need to be a model for patients where bile doesn't reach the intestine.

The animals will be divided randomly into two groups: a group receiving bile duct cannulation and a group receiving a sham operation instead. Both groups will be divided into three groups again (control vs two new formulations based on different lipophilic drugs, bile salts or surfactants). The sham operation group will serve as the control group.

The formulation will be given intragastrically to the animals and blood samples will be drawn at different time points.

Subsequently, the rats will be euthanized. Blood samples will be analysed by a previously validated method of analysis and pharmacokinetic parameters, like maximum plasma concentration (T_{max}) and area under the curve (AUC), will be calculated. Those pharmacokinetic parameters are the primary outcome parameters.

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.

Animals will start by having surgery with isoflurane anaesthesia (including adequate analgesia):

- Receiving bile duct cannulation or a sham operation as a control group. The sham operation consists of the same procedure, however without the cannula being placed.
- Receiving jugular vein cannulation.

The bile duct cannulation will be done by making an incision below the ribcage. The bile duct will be located, isolated and cannulated. The cannula will be tunnelled to the back of neck to allow the bile to drip out of the animal [12]. The cannula will be sufficiently long enough to enable collecting the bile out of the cage. In the

2-day period between operation and experiment, the residue of bile in the intestine will be absorbed sufficiently by the intestine and therefore the influence of endogenous bile on the absorption of lipophilic drugs is absent.

The sham operation consists of the same procedure, however without the cannula being placed.

For the jugular vein cannula an incision in the neck of the animal will be made through which the jugular vein can be located, isolated and cannulated. The cannula will be tunneled to the back of the neck. Cannulas will be filled and flushed with 10 IU/ml heparin in saline to maintain cannula patency.

Animals will rest and recover for 2 days with free access to food in a normal cage with sawdust. And post-operative analgesia (pain killer) will be provided.

After recovery the animals will be brought back to the standard animal rooms and fasted over night before intragastrical administration of the new medicine by using a gavage. The small intestines will be emptied from food during this period of fastening and influence of diet will thereby be minimised.

After treatment blood samples (max 8 ml / kg in total) will be drawn at different time points from the jugular vein cannula with minimal discomfort for the animal.

Bile duct cannulation (and not ligation) is chosen since this has the least impact on the animal: if a rat will be ligated, the bile can't flow away. Due to the fact that rats do not have a gallbladder, the bile will build up directly in the liver. This will make the rats uncomfortable and may possibly lead to diseases like jaundice. By putting a cannula in the bile duct the bile will freely drop away outside of the animal, leading to less discomfort for the animal. Another advantage of cannulation is that it will be possible to collect the bile and use this in *in vitro* experiments.

Since all animals need to receive surgery anyway to turn into a model where bile doesn't reach the intestine, it is decided to add a jugular vein cannula as well. This way there is no extra discomfort for the animal and frequent blood sampling will barely lead to discomfort for the animal.

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

In this type of experiment mixed micelles are tested on their absorption profile; outcome parameters are blood concentrations over time (C_{max} , area under the curve (AUC), $t_{1/2}$).

The group size is calculated using Lehr's formula based on data from pilot studies done in the past (conducted in Melbourne, Australia in November 2015, out of the reach of this project) (standardized difference of 2 and SD of 1,3975), a power of 80% and a two-sided significance level of 0,05. This leads to a group size of 6-8 animals.

B. De dieren

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

Mature rats (6-8 weeks, 250g \pm 25g) bred in Europe and of commercial origin will be used. Both male and female rats can be used. Rats are selected because they are the most widely used animals in biomedical research. Second of all, rats are the smallest animals by whom it will be possible to cannulate their bile ducts. Thirdly, rats with bile duct cannulation have often been used as a model where bile doesn't reach the intestine [12].

Number of animals

Experiments will be set up in a way to compare one or multiple new formulations with a control (a glycocholic acid/egg phospholipid based formulation that is already on the market). In one experiment, on average two new formulations will be compared to a control ($3 \times 8 = 24$ animals). All new formulations based on different lipophilic vitamins (A, E, D and K) and will be tested in cannulated and non-cannulated animals (sham operation) ($24 \times 2 = 48$ animals). Unexpected loss of animals can be caused by surgical trauma. 5 animals will be used in a training and a pilot study first to gain the necessary skills for personnel to avoid excessive loss of animals. After training loss of animals is estimated on 20% ($120\% \times 48 = 58$ animals (+5 for training)). This type of experiment will be done approximately 3 times a year ($58 \times 3 = 174$ animals (+5 for training)) considering repetition of the same vitamin. This leads to an estimation of $174 \times 5 = 870 + 5$ animals for training is 875 animals in total that will be needed for this type of experiment for the entire project

duration of 5 years (maximum of 15 new formulations).

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.

Replacement

In vitro experiments will be done as much as possible. Unfortunately, the currently existing cell models can't give reliable data about absorption and permeation of highly fat soluble medicines or bile acids. This is because a cell model is an emasculated model for reality, missing features like a mucus layer and lymph and unable to form and secrete the vitamin K normally.

Reduction

The delivery systems will be tested *in vitro* and *ex vivo models* (organoids) first to allow a further screening and therefore to possibly use fewer animals. Also, the pilot study has been done to properly calculate an adequate sample size.

Personnel will be trained first to gain the necessary skills to avoid more loss of animals, making it possible to have smaller group sizes and still a sufficient power. This all leads to the reduction of the animals.

Refinement

The rat is chosen as the model because there is extensive knowledge and expertise in this species. There are a large number of bile duct cannulation models available for rats.

By cannulating instead of ligating the bile duct the model is more refined leading to less discomfort for the animals. Also, giving the animals a jugular vein cannula since the rats are under anesthesia anyway, refines the model. Last of all, giving the animals harmless drugs, like vitamin K, will refine the model, since there will barely be side effects. The total approach will prevent the animals from suffering from unnecessary pain or discomfort.

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.

Until surgery rats will be housed in groups and have access to nesting material and *ad libitum* food and water.

To give the rats a jugular vein cannula reduces the pain and stress of drawing blood samples. Also by giving harmless active pharmaceutical components, like vitamin K, nor harmless excipients (semi-natural and natural compounds), rats will have no harmful effects of the ingredient. This will prevent them from a lot of unnecessary pain or discomfort.

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.

Not applicable

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.

The animals will be housed individually after surgery. However, they will be housed in the same room so they can still see, hear and smell each other.

After surgery the animals will have, amongst others, the jugular vein cannula sticking out of their neck. The cannula will be led through a tube attached to a jacket, but not every part of the cannula will be hidden, meaning rats could chew on each other's cannula. If the cannula is broken, rats will bleed to death. Thus, for their own safety, rats must be housed alone after surgery.

Also rats have the bile duct cannula sticking out of their neck. This cannula will be led out of the cage via the jacket to be able to collect the bile. However, if rats would be housed in one cage, chewing on the cannula could lead to rats licking each other's cannula, which would have a negative impact on the experiment. Therefore it is necessary to house the rats solitarily after surgery.

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.

Postoperative analgesics will be applied in consultation with a veterinarian from the laboratory animal facility.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Solitary housing is absolutely necessary due to cannulations and to prevent bile uptake. Animals will be fasted over night before intragastrical administration of the new medicine by using a gavage the next day.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

After surgery the animals will have, amongst others, the jugular vein cannula sticking out of their neck. The cannula will be led through a tube attached to a jacket, but not every part of the cannula will be hidden, meaning rats could chew on each other's cannula. If the cannula is broken, rats will bleed to death. Thus, for their own safety, rats must be housed alone after surgery.

Also rats have the bile duct cannula sticking out of their neck. This cannula will be led out of the cage via the jacket to be able to collect the bile. However, if rats would be housed in one cage, chewing on the cannula could lead to rats licking each other's cannula, which would have a negative impact on the experiment. Therefore it is necessary to house the rats solitarily after surgery. Since oral medicines will be tested, it will be necessary to keep the number of influences on the results to a minimum. When animals can eat, the food adds a huge variability to the experiments. Therefore, it will be needed to fasten the rats (12 hours maximum).

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

The period for fasting the rats after recovery will be kept as short as possible (maximum of 12 hours), so the discomfort of solitarily housing and fasting for the animals is as low as possible. Rats will be fasted overnight (8 hours) and are allowed to eat four hours after administration of the formulations. Four hours of fasting after administration will be enough to let the formulation be absorbed as was indicated by the pilot study.

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.

Loss of animals is expected to be 20% after training. For this type of experiment this will concern 175 rats. Those animals can be lost during surgery as well as after surgery. During surgery animals can be lost, for example because of too much blood loss. After surgery humane endpoints should be applied when animals have a clogged cannula (either bile or jugular vein), an infection in the wound or when an animal clearly shows unusual behaviour.

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

The estimation is that 20% of all animals will reach one of the above mentioned criteria.

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.

The cumulative discomfort classification will be set on 'matig'. The surgery requires full anaesthesia. This is moderate discomfort. When an animal drops out, this can be caused by 'severe' inconvenience. All the other things that will be done to the animals can be classified as 'light'.

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.

When animals have received bile duct cannulation, they won't be able to properly absorb their food after the experiment, because bile can't reach the intestines anymore.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef |
|------------|--------------------|
| 2 | Distribution study |

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.

The objective of this experiment is to determine the main absorption site of the lipophilic drug and the distribution of the new delivery systems in the small intestine. This will be achieved by use of fluorescently labelled mixed micelles.

The animals will be divided into two groups: a group receiving bile duct cannulation and a group receiving a sham operation instead. Both groups will be divided into two groups again (control vs a new formulation based on different lipophilic drugs, bile salts or surfactants). The sham operation group will serve as the control group.

Rats are given an intragastrical administration of a fluorescently labelled new formulation based on different lipophilic drugs, bile salts or surfactants or a fluorescently labelled control group.

Four hours after administration the animal will be euthanized and immediately dissected to harvest the entire intestine. This will be segmented. All individual segments will be observed under the IVIS Imaging System, which shows the fluorescently labeled formulations, after which the segments will be rapidly stored at -80 °C until further quantitative analysis of lipophilic drugs extracted from above segments.

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.

Animals will start by having surgery with isoflurane anaesthesia (including adequate analgesia):

Receiving bile duct cannulation or a sham operation. The sham operation consists of the same procedure, however without the cannula being placed.

The bile duct cannulation will be done by making an incision below the ribcage. The bile duct will be located, isolated and cannulated. The cannula will be tunnelled to the back of neck to allow the bile to drip out of the

animal [12]. The cannula will be sufficiently long enough to enable collecting the bile out of the cage. The residue of bile in the intestine will be absorbed sufficiently by the intestine and therefore the influence of endogenous bile on the absorption of lipophilic drugs is limited.

The sham operation consists of the same procedure, however without the cannula being placed.

Animals will rest and recover for 2 days with free access to food in a normal cage with sawdust. And post-operative analgesia (pain killer) will be provided.

After recovery the animals will be brought back to the standard animal rooms and fasted over night before intragastrical administration of the new medicine by using a gavage. The small intestines will be emptied from food during the fastening and influence of diet will be minimised.

In order to clearly locate the position of mixed micelles in the entire intestine, rats will be euthanized 4 hours after administration of the new formulation.

Bile duct cannulation (and not ligation) is chosen since this has the least impact on the animal: if a rat will be ligated, the bile can't flow away. Because rats don't have a gallbladder, the bile will build up directly in the liver. This will make the rats uncomfortable and may possibly lead to diseases like jaundice. By putting a cannula the bile will freely drop away on the outside of the animal, leading to less discomfort for the animal. On top of this, it will also be possible to collect the bile and use this in *in vitro* experiments.

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

In this type of experiment the outcome will be the intensity of fluorescently labelled micelles in the different parts of the intestine.

The group size is calculated using Lehr's formula based on data from literature: a standardized effect of 0,05, a standard deviation of 0,0225 [11], a power of 80% and a two-sided significance level of 0,05. This leads to a group size of 6-8 animals.

B. De dieren

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

Mature rats (6-8 weeks, 250g ± 25g) bred in Europe and of commercial origin will be used. Both male and female rats can be used. Rats are selected because they are the most widely used animals in biomedical research. Second of all, rats are the smallest animals by whom it will be possible to cannulate their bile ducts. Thirdly, rats with bile duct cannulation have often been used as a model where bile doesn't reach the intestine [12].

Number of animals

Experiments will be set up in a way to compare two new formulations with a control group (a glycocholic acid/egg phospholipid based formulation that is already on the market as a control, 8x3=24 animals). Maximum of 5 new formulations based on different lipophilic vitamins (A, E, D and K) will be tested in cannulated and non-cannulated animals (sham operation) (24x2=48 animals). Unexpected loss of animals can be caused by surgical trauma. 5 animals will be used in a training first to gain the necessary skills for personnel to avoid more loss of animals. Those 5 animals are the same as discussed in attachment 1. After training loss of animals is estimated on 20% (20%x48=10 animals). This type of experiment will be done approximately 2 times a year ((48+10)x2=116 animals) considering the repetition of the same formulation. This leads to an estimation of 116x5=580 animals in total that will be needed for this type of experiment for the entire project duration of 5 years.

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.

Replacement

In vitro experiments will be done as much as possible. Unfortunately, *in vitro* experiments can tell us nothing about the distribution of particles through the entire intestinal tract. *In vitro* models can tell something about parts of the intestine, but *in vitro* models do not show the entire GI-tract. For this reason, distribution studies can not be done in *in vitro* models.

Reduction

The delivery systems will be tested *in vitro* and *ex vivo models* (organoids) first to allow a further screening and therefore to possibly use fewer animals.

Personnel will be trained first to gain the necessary skills to avoid more loss of animals, making it possible to have smaller group sizes and still a sufficient power.

Lastly, in case the pharmacokinetics study of a new formulation does not demonstrate absorption, a distribution study will not be conducted. This all leads to the reduction of the animals.

Refinement

The rat is chosen as the model because there is extensive knowledge and expertise in this species. There are a large number of bile duct cannulation models available for rats.

By cannulating instead of ligating the bile duct the model is more refined leading to less discomfort for the animals. Last of all, giving the animals harmless drugs, like vitamin K, will refine the model, since there will barely be side effects. The total approach will prevent the animals from suffering from unnecessary pain or discomfort.

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.

Until surgery rats will be housed in groups and have access to nesting material and *ad libitum* food and water.

Also by giving harmless active pharmaceutical components, like vitamin K, nor harmless excipients (semi-natural and natural compounds) rats will have no harmful effects of the ingredient. This will prevent them from a lot of unnecessary pain or discomfort.

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.

Not applicable

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.

The animals will be housed individually after surgery. However, they will be housed in the same room so they can still see, hear and smell each other.

After surgery the rats will have the bile duct cannula sticking out of their neck. The cannula will be led

through a tube attached to a jacket, but not every part of the cannula will be hidden, meaning rats could chew on each other's cannula. This cannula will be led out of the cage via the jacket to be able to collect the bile. However, if rats would be housed in one cage, chewing on the cannula could lead to rats licking each other's cannula, which would have a negative impact on the experiment. Therefore, it is necessary to house the rats solitarily after surgery.

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.

Postoperative analgesics will be applied in consultation with a veterinarian from the laboratory animal facility.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Solitary housing is absolutely necessary due to cannulations and to prevent bile uptake. Animals will be fasted over night before intragastrical administration of the new medicine by using a gavage the next day.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Rats have the bile duct cannula sticking out of their neck with bile being collected outside of the cage. When multiple animals are housed in 1 cage, it would be possible for the rats to chew each other's bile duct cannula and lick the bile, leading to a failed experiment. Therefore solitarily housing is absolutely necessary.

Distribution can be completely different when food or digesting food is present in the GI-tract. To be able to keep the variability low, animals need to have no food in their tracts. Therefore, it will be needed to fasten the rats.

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

The period for fasting the rats after recovery will be kept as short as possible (overnight, maximum of 12 hours), so the discomfort of solitarily housing and fasting for the animals is as low as possible.

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.

Loss of animals is expected to be 20% after training. Animals can be lost during surgery as well as after surgery. During surgery animals can be lost, for example because of too much blood loss. After surgery humane endpoints should be applied when animals have a clogged cannula (either bile or jugular vein), an infection in the wound or when an animal clearly shows unusual behaviour.

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

The estimation is that 20% of all animals will reach one of the above mentioned criteria. For this type of experiment this will concern 116 rats maximally.

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.

The cumulative discomfort classification will be set on 'matig'. The surgery requires full anaesthesia. This is moderate discomfort. When an animal drops out, this can be caused by 'severe' inconvenience. All the other things that will be done to the animals can be classified as 'light'.

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.

The experiment involves dissecting the animals to be able to investigate the distribution of the particles in the intestines. Euthanizing the animals is absolutely necessary for this reason.

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

[REDACTED]

Van: Info-zbo
Verzonden: woensdag 1 maart 2017 9:56
Aan: [REDACTED]
CC: [REDACTED]
Onderwerp: FW: AVD108002017846:aanvullende informatie

Geachte [REDACTED]

Op 24 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients" met aanvraagnummer AVD105802017846.

De CCD heeft uw aanvraag besproken en heeft nog een aanvullende vraag over uw project.

-Heeft u 'physiologically based pharmacokinetic modelling' overwogen? Kunt u aangeven waarom dit wel/niet toepasbaar is voor dit project?

Opsturen informatie

U heeft 14 dagen de tijd om de ontbrekende informatie op te sturen. U kunt deze informatie onder vermelding van het aanvraagnummer (AVD108002017846) aanleveren via NetFTP of per e-mail.

Wanneer een beslissing

De beslistermijn op uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat bovengenoemde informatie is ontvangen. Na ontvangst van uw reactie/de ontbrekende informatie nemen wij uw aanvraag verder in behandeling. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 280028

E: info@zbo-ccd.nl (Let op: nieuw e-mail adres)

Deelnamenummer NVWA 10800, Utrecht University**03-03-2017**

Remark 1. What *in vitro* experiments are used to evaluate the criteria before *in vivo* studies?

Before the *in vivo* study, the following *in vitro* experiments are used to evaluate the criteria for different formulations (vitamin K loaded micelles):

a) Stability at gastric pH

Orally administered Konakion[®] MM (a commercial formulation of vitamin K) fails to prevent Vitamin K deficiency bleeding in cholestatic infants due to impaired intestinal absorption of vitamin K due to the pathophysiological conditions in the upper gastrointestinal tract of those infants. Konakion[®] MM is unstable and forms large aggregates at low pH of the stomach because of the protonation of the carboxylate group of glycocholic acid (one of the components of Konakion[®] MM), eventually causing coalescence of the formulation. To study the stability of various vitamin K loaded micelles, size changes were measured by DLS (Dynamic Light Scattering). Only vitamin K loaded micelles which are stable (size remain the same) without coalescence will be further studied.

b) Stability and diffusion in mucus

We applied FRET (Förster resonance energy transfer) to investigate the stability of vitamin K loaded micelles (fluorescently labeled micelles) in mucus. Furtherly, diffusion of fluorescently labeled vitamin K loaded micelles are studied by fluorescently recovery after photo-bleaching technique. Only stable and permeable vitamin K loaded micelles in mucus will be further studies for *in vivo* studies.

c) Uptake and transport study using Caco-2 cell monolayers

Different vitamin K loaded micelles are exposed to fasted state simulated gastric or intestinal fluids (FaSSGF and FaSSIF) to mimic the condition of G-I tract. Subsequently, uptake or transport of vitamin K by differentiated Caco-2 cells are investigated. In this way, vitamin K loaded micelles which have higher uptake efficacy than commercial Konakion[®] MM will be further studied using organoids from Ileum.

d) Uptake and transport study using organoids from Ileum

One drawback of Caco-2 cells is that they don't create mucus. So promising vitamin K loaded micelles from section c) will be further evaluated using organoids from Ileum which can create mucus and are more physiologically relevant to G-I tract than Caco-2 cells.

Vitamin K loaded micelles which have higher uptake or transport efficacy than commercial Konakion[®] MM will be finally studied for in vivo study.

Remark 2. Why we don't use physiologically based pharmacokinetic modelling in our project before the in vivo study?

Physiologically based pharmacokinetic (PBPK) models can help reduce animal use by allowing an extrapolation to other dosing regimens within a species, and thus help the design of future studies. However, this type of model does not eliminate the need for *in vivo* experiments and there is a lack of accuracy in describing the disposition and elimination processes making oral predictions less reliable. The oral absorption process is complex and in many cases has been shown to be species-specific [1, 2]. Based on previous literature, predictions of oral C_{max} , AUC and T_{max} based on in silico PBPK model is more successful for Biopharmaceutical Classification System (BCS) class 1 compounds (when the absorption mechanism is based on passive permeability and lipophilicity of a drug can be predicted by logP value) compared to BCS class 2, 3 and 4 drugs [3]. In our case, the compound (vitamin K) we are investigating belongs to BCS class 2 (absorption mechanism is not only based on passive permeability but also receptors like scavenger receptor B1, CD-36, NPC1L1 mediated). And the mechanism is even more complex because vitamin K will be packed into chylomicrons inside the cells and will be translocated into the blood circulation via lymph duct from the small intestine. Above factors make it more difficult to build a PBPK model to predict the oral bioavailability of our vitamin K loaded micelles. However, it will be nice to find collaborations with groups who have available commercial software like Gastro plus and are experts in this field (to evaluate the predictions, normally hundreds of model compounds need to be applied to ensure a reliable calculation). We will consider about that and thank you for such valuable suggestions.

[1] L. Di, B. Feng, T.C. Goosen, Y. Lai, S.J. Steyn, M.V. Varma, R.S. Obach, A perspective on the prediction of drug pharmacokinetics and disposition in drug research and development, *Drug Metabolism and Disposition*, 41 (2013) 1975-1993.

[2] H. Musther, A. Olivares-Morales, O.J. Hatley, B. Liu, A.R. Hodjegan, Animal versus human oral drug bioavailability: Do they correlate?, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 57 (2014) 280-291.

[3] N. Gobeau, R. Stringer, S. De Buck, T. Tuntland, B. Faller, Evaluation of the GastroPlus[™] Advanced Compartmental and Transit (ACAT) Model in Early Discovery, *Pharmaceutical research*, 33 (2016) 2126-2139.

Disciplinegroep Biofarmacie en Farmaceutische Technologie
| Departement Farmaceutische Wetenschappen | Faculteit Betawetenschappen | Universiteit Utrecht | David de Wied gebouw | Universiteitsweg 99 | Postbus 80082 - 3508 TB Utrecht | T: | F: | E:

**Centrale Commissie Dierproeven**

> 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

AVD108002017846

Bijlagen

1

Datum 6 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 24 januari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients" met aanvraagnummer AVD108002017846. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Wij hebben u om nadere informatie gevraagd over de in bijlage 3.4.4.1 beschreven pilot en het ongerief dat de dieren zullen ondergaan. Wij kunnen ons vinden in de nadere verduidelijking van uw aanvraag. Wij hebben u nadien gevraagd toe te lichten welk type in vitro experimenten voorafgaand aan de in vivo proeven worden uitgevoerd en te onderbouwen waarom fysiologisch gebaseerde farmacokinetische modellen niet worden toegepast. Wij kunnen ons niet volledig vinden in uw antwoord op de tweede vraag. Zie 'Beslissing' voor meer informatie. U heeft, naar aanleiding van onze vragen, uw aanvraag gewijzigd op 16 februari 2017, 28 februari 2017 en 3 maart 2017.

Beslissing

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

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

De aanvraag is gericht op het ontwikkelen van een nieuw afgiftesysteem voor medicijnen. Het project is opgedeeld in een tweetal fasen, te weten een farmacokinetiekstudie (bijlage 3.4.4.1) en een distributiestudie (bijlage 3.4.4.2). Wij hebben u in het kader van vermindering gevraagd welk type in vitro experimenten voorafgaand aan de in vivo proeven worden uitgevoerd. Daarnaast hebben we u ook gevraagd te onderbouwen waarom fysiologisch

gebaseerde farmacokinetische modellen niet kunnen worden toegepast. Hoewel wij ons kunnen vinden in uw toelichting over de uit te voeren in vitro experimenten, zijn wij er niet van overtuigd dat het niet mogelijk is fysiologisch gebaseerde farmacokinetische modellen te gebruiken voor dit project. U geeft zelf ook aan dat het met de juiste software en in samenwerking met experts wellicht wel mogelijk is een dergelijk model te ontwikkelen en toe te passen.

In artikel 10 lid 1 sub a van de wet staat 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. Aangezien het uitvoeren van fysiologisch gebaseerde farmacokinetische modellen kan leiden tot een significante reductie in het benodigd aantal dieren, hebben wij een voorwaarde aan de vergunning toegevoegd. U dient voorafgaand aan de studie in samenwerking met experts na te gaan of het mogelijk is fysiologisch gebaseerde farmacokinetische modellen te ontwikkelen en gebruiken voor uw project. De resultaten van dit onderzoek dient u ter goedkeuring aan de CCD voor te leggen.

U kunt met uw project "Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients" starten. De vergunning wordt afgegeven van 6 april 2017 tot en met 1 april 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 Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 19 januari 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij 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:
6 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD108002017846

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:

6 april 2017

Aanvraagnummer:

AVD108002017846

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:

**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 6 april 2017 tot en met 1 april 2022, voor het project "Delivery systems for lipophilic drugs to improve their bioavailability in cholestatic patients" met aanvraagnummer AVD108002017846, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair hoofddocent.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 24 januari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 3 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 3 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 19 januari 2017, ontvangen op 24 januari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 16 februari 2017, 28 februari 2017 en 3 maart 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Pharmacokinetics study				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	875	20% Ernstig 80% Matig	
3.4.4.2. Distribution study				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	580	20% Ernstig 80% 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 april 2023

Aanvraagnummer:

AVD108002017846

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.

U dient in het kader van vermindering voorafgaand aan de uitvoering van het project, in samenwerking met experts op het gebied van fysiologisch gebaseerde farmacokinetische modellen, te onderzoeken of dergelijke modellen gebruikt kunnen worden voor dit project. De resultaten van dit onderzoek dient middels een wijzigingsaanvraag ter goedkeuring aan de CCD te worden voorgelegd. De CCD zal op basis van deze aanvullende informatie beoordelen of de farmacokinetiekstudie al dan niet uitgevoerd mag worden. Het betreft hier een opschortende voorwaarde. U mag pas met de farmacokinetiekstudie starten zodra u van de CCD goedkeuring heeft gekregen.



Aanvraagnummer:

AVD108002017846

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:

AVD108002017846

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 W17-09									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2017874								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud			x					
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4 oud			x					
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Aanvulling aanvraag				x		x	x	
10	Projectvoorstel nieuw			x					
11	Bijlage beschrijving dierproeven 1 nieuw			x					
12	Bijlage beschrijving dierproeven 2 nieuw			x					
13	Bijlage beschrijving dierproeven 3 nieuw			x					
14	Bijlage beschrijving dierproeven 4 nieuw			x					
15	DEC-advies				x		x	x	
16	Advies CCD		x						x
17	Beschikking en vergunning				x		x	x	

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.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 10400 874

Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie Wageningen University

Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde

KvK-nummer 9215846

Straat en huisnummer Akkermaalsbos 12

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.

Postbus 59

Postcode en plaats 6700 AB Wageningen

IBAN NL10 RABO 0397066465

Tenaamstelling van het rekeningnummer Wageningen UR

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters Dhr. Mw.

Functie Onderzoeker

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

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

(Titel) Naam en voorletters Dhr. 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 | 30 - 11 - 2017 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Influence of solid feed intake on digesta passage rate and phosphorus requirements of veal calves
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Invloed van ruw- en krachtvoer op fosforbehoefte vleeskalveren
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|----------------------------------|
| Naam DEC | DEC-WUR |
| Postadres | Postbus 9101, 6700 HB Wageningen |
| E-mailadres | dec@wur.nl |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1684 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
 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
- Bestel order wordt nagestuurd.*

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	Wageningen 
Datum	21 - 2 - 2017
Handtekening	

**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'.	10400
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University
1.3 Provide the title of the project.	Influence of solid feed intake on digesta passage rate and phosphorus requirements of veal calves

2 Categories

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

Higher education or training

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Veal calves are traditionally fattened on a diet consisting only of milk replacer (MR). From a welfare and economic perspective, there is a strong incentive to replace a considerable portion of the MR by solid feeds (SF) in the diet (see e.g. Webb et al., 2015). Therefore, SF comprising roughages and concentrates, represent an increasingly important source of nutrients for veal calves. However, veal calves will still be fed a proportion of MR in their diet for approximately 9 months of age to achieve the paleness of white veal meat.

Interactions between MR and SF, mostly occurring in the gastro-intestinal tract, complicate the prediction of the nutritional value of these ration components. Quantitative information about passage rate kinetics of SF through the rumen and other gastro-intestinal compartments currently hampers progress in this field. Limited information available (Berends et al., 2015a) indicates that the level of SF feeding affects ruminal passage rates, more so for concentrates compared with straw, with estimates of mean retention time being considerable higher than in calves exclusively fed on SF. This impacts the nutritional value of SF and also the potential of nutrient recycling via the rumen. Studies for measuring passage rate kinetics traditionally involve recovery of indigestible tracer inside various compartments of the gastro-intestinal tract (e.g. Berends et al. 2015a), or faecal excretion curves of indigestible markers. These techniques involve sacrificing experimental animals, thus preventing repeated measures on a subject, and/or individual housing on balance cages. Novel technologies to measure passage rate kinetics include the measurement of recovery of ¹³C tracers in breath (e.g. McCue and Welch, 2016) but these techniques have not been tested and validated in calves.

Recycling of nutrients from the MR back into the rumen has been demonstrated for nitrogen in many types of ruminant animals, including veal calves (Berends et al., 2014, 2015b). Also for phosphorus (P), recycling from blood, via saliva, back into the rumen has been demonstrated to occur in ruminants. Like with nitrogen, exploiting this potential can contribute to the P economy of the calf. Typically, MR ingredients are rather rich in P. Upon consumption, MR flows directly to the abomasum, i.e. bypassing the rumen, and from there to the small intestine. P absorbed from the MR thus enters the systemic circulation. Through saliva, P can recycle back into the rumen, thus providing P originating from MR with a second chance to be utilized. Currently, P contents of the SF portion of the veal calf diet are not optimized to take this type of recycling into account. Hence there is an opportunity to reduce the P content of SF, thereby contributing to steering or reducing in P excretion into the environment. For the Netherlands, a reduction of P excretion is vital to arrive below the maximum set by EU regulations.

Literature

Berends, H., van den Borne, J. J. G. C., Røjen, B. A., van Baal, J. & Gerrits, W. J. J. 2014. Urea Recycling Contributes to Nitrogen Retention in Calves Fed Milk Replacer and Low-Protein Solid Feed. *The Journal of Nutrition*. 144, 7, p. 1043-1049

Berends, H., van den Borne, J. J. G. C., Stockhofe-Zurwieden, N., Gilbert, M. S., Zandstra, T., Pellikaan, W. F., van Reenen, C. G., Bokkers, E. A. M. & Gerrits, W. J. J. 2015a. Effects of solid feed level and roughage-to-concentrate ratio on ruminal drinking and passage kinetics of milk replacer, concentrates, and roughage in veal calves. *Journal of Dairy Science*. 98, 8, p. 5621-5629

Berends, H., van den Borne, J. J. G. C., Røjen, B. A., Hendriks, W. H. & Gerrits, W. J. J. 2015b. Effect of protein provision via milk replacer or solid feed on protein metabolism in veal calves. *Journal of Dairy Science*. 98, 2, p. 1119-1126.

McCue, MD and Welch KC jr. 2016. ¹³C breath testing in animals: theory, applications and future directions. *J. Comp. Physiol. B* (2016) 186: 265-285.

Webb, L. E., van Reenen, C. G., Berends, H., Engel, B., de Boer, I. J. M., Gerrits, W. J. J. & Bokkers, E. A. M. 2015. The role of solid feed amount and composition and of milk replacer supply in veal calf welfare. *Journal of Dairy Science*. 98, 8, p. 5467-5481

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?

In this project, we will address three important research questions:

- 1) Can digesta passage rate kinetics in calves (with emphasis on the rumen) be measured using non-invasive ¹³C tracer breath test approach?
- 2) What is the effect of SF intake and roughage to concentrate ratio on passage rate kinetics of MR and concentrates
- 3) What are the P requirements of calves fed rations with different MR to SF ratios and different SF compositions (i.e., different concentrate to roughage ratios).

The underlying issue of the latter 2 questions is to what extent can we exploit P recycling as a mechanism to steer/reduce P excretion in veal calves fed combinations of SF and MR.

3.3 Relevance

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

Inside the various compartments of the gastro-intestinal tract, there is always competition between passage and degradation of macronutrients. With increasing passage rate within a compartment, time for degradation decreases, hence reducing the efficiency of nutrient digestion in that compartment. Depending on the rate of feed intake, this reduced efficiency may lead to a decrease in nutrient absorption or not. For predicting the feeding value of MR, concentrates and roughages (together comprising the SF component of the diet) it is pivotal to know passage rate kinetics. Such information typically is integrated into mathematical models predicting nutrient absorption following the provision of various dietary regimes. Such models are already available for pigs, dairy cows and for calves fed exclusively on milk replacers. Currently, a calf model is being developed

integrating rumen development, rumen function and post-absorptive nutrient metabolism. This model will be used for designing and evaluation of feeding strategies in veal calves, fed various combinations of MR and SF. Reliable information about passage rate kinetics of the different ration components has been identified as limiting the quality of such models. Current approaches to the measurement of passage rate kinetics involve the use of indigestible marker techniques, either requiring prolonged individual housing, or sacrificing of experimental animals, the latter preventing repeated measures on a subject. Novel, minimally invasive, $^{13}\text{CO}_2$ breath test approaches could, in part, replace such approaches, but need to be developed and tested.

Reducing P excretion in the environment has been identified as an important target by the Dutch government, as P excretion has exceeded the limits set by EU in 2015. For extending the derogation for 2017 and beyond, prevention of P excretion exceeding these limits is of utmost importance. Furthermore, reducing P inputs (via dietary manipulation) will also contribute to a sustainable use of resources. This research will contribute positively to control both P inputs and P excretion. First, as mentioned previously, MR ingredients are rather rich in P. This, combined with the recycling of P in the rumen, provides the opportunity to reduce the P content of SF, thus reducing P inputs. Second, by determining the P requirements of calves, we are able to control the P excretion. Third, integrating knowledge into mathematical models will allow more accurate predictions of nutrient use and environmental excretion under widely varying nutritional regimes. Moreover, this research will contribute to less invasive measurements (increased refinement) of passage rate kinetics in future experimental animals.

3.4 Research Strategy

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

Within the present project we aim to quantify passage rate kinetics of MR, concentrates and roughages under 4 different dietary regimes. We will also determine P requirements in calves under the same 4 dietary regimes. As adaptation of calves to these dietary regimes will take time (about 4 weeks), we will minimize the number of calves required by performing a series of experiments, using the same calves. First, a pilot experiment will be performed (see section 3.4.2 and annex 1) to determine whether P requirements can be determined for individual calves with a step-wise within animal dose response approach, similar to Kampman van de Hoek et al. (2012) for studying limiting amino acids in pigs. The principle of the technique is that after providing an excess of P via MR, the P intake will be reduced via MR, leading to a reduction of P excreted via urine. The inflection point of the P-excretion curve against P intake will be assessed via nonlinear regression and assumed to represent the requirement of that calf. The plateau value, obtained at the lowest P intake will represent the maximum efficiency of P utilization, likely influenced by SF intake. The advantage of such a technique is that it potentially provides estimates of P requirements of individual calves. For the pilot study, only the rate of adaptation of urinary P excretion following a substantial reduction in P intake via the MR will be monitored in a limited number of calves. If the rate of urinary P excretion stabilizes within 72h after the reduction in dietary P supply, the technique can be considered applicable for individual calves. If

this is the case, the different dietary regimes will be imposed on calves, subsequently followed by two studies to investigate passage rate kinetics of MR, concentrates and roughages (see section 3.4.2 and both annex 2 and 3), followed by a study to quantify P requirements under these nutritional conditions in each calf (see section 3.4.2 and annex 4). If the within-calf dose response technique does not work, a more traditional, between animal, dose response approach will be used (see e.g. Erickson et al., 2002), comparing P excretion at different levels of intake between animals. Hence, this project comprises 4 studies, with studies 2, 3, and 4 (annex 2, 3, and 4, respectively) being performed with the same calves. The calves in the pilot study (annex 1) will be about 6 to 8 weeks of age. The age of the calves at each of the 3 consecutive studies (annex 2, 3, and 4) will differ, as these studies are performed sequentially, (re-)using the same 48 calves. These studies will be performed in six batches. At start of the first passage rate kinetics study (annex 2), calves of approximately 6 weeks of age will be purchased from a veal producer. The first batch of calves (n=8) will adapt to the diet for 5 weeks, subsequently followed by 7 days of measurements in the respiration chambers, and subsequently followed by the second passage rate kinetics study (annex 3) and the P requirement study (annex 4). For batch 2 to 6, the same procedure will be used, with a delay of about 1 week for each batch. Hence, the results will be obtained over an age-range of about 6 weeks. The common interest in these three studies is the combination of the nutritional treatments, of which it takes time for calves to adapt (rumen development). With discomfort for the calves estimated as mild for the studies in annex 2 and 3, we consider it the best option. to re-use calves from the study in annex 2 for annex 3 and 4. As argued in annex 2 and 4, the number of calves required is approximately the same. For the studies in annex 2 and 3, comparison of observations on the same animals is important.

Literature

Erickson GE, Klopfenstein TJ, Milton CT, Brink D, Orth MW and Whitted KM. 2002. Phosphorus requirements of finishing feedlot calves.. J. Anim., Sci. 80(6) 1690-1695.

Kampman-van de Hoek, E, Gerrits, WJJ, van der Peet-Schwering, CMC Jansman, AJM and van den Borne, JJGC 2013. A simple amino acid dose-response technique to quantify amino acid requirements of individual meal-fed pigs Journal of Animal Science. 91, 10, p. 4788-4796

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.

As described above, the project will consist of 4 studies:

1. P requirements in veal calves - a pilot study. The objective of this study is to test whether a within-animal approach can be used to study P requirements. The outcome will determine the design of study 4. This study will be conducted with calves, individually housed on balance cages and provided with faecal collection bags to allow separate, quantitative collection of urine and faeces. The study duration will be 4 days (adaptation) and 6 days (experiment)
2. Passage rate kinetics in veal calves - ^{13}C tracer technique: Minimally invasive technique with stable isotope methods. This technique is based on a breath-test approach described by Van den Borne et al. (2015), and techniques widely used in humans and animals (McCue and Welch, 2016). Briefly, following a pulse dose of a ^{13}C tracer, ^{13}C labelled CO_2 is collected in exhaled air. If the tracer is well chosen, the exhalation pattern of the tracer will reflect the pattern of nutrient absorption and metabolism of the tracee. As the primary interest is in the timing of nutrient absorption, metabolism patterns as well as delays in exhalation caused by dilution in body pools need to be corrected for. For this study, calves will be purchased at an age of 6 weeks and adapted to the nutritional treatments for a period of 5 weeks in group-housing. The measurements will be conducted in pair-housed calves in climatized respiration chambers, frequently fed a SF mix (i.e., 6 times a day to create a steady state), and fed a MR twice daily. Different isotope tracers will be administered through the diet, spread over the 7d experimental period.
3. Passage rate kinetics in veal calves - faecal excretion curves. Faecal excretion patterns of indigestible markers in faeces following a pulse dose of markers representative for MR, concentrates and roughages. Following the approach described by Dhanoa et al., (1985). Briefly, this approach is based on the assumption that excretion kinetics of an indigestible marker will reflect retention time of digesta in the slowest compartment. This study will be conducted in a setting similar to study 1, with frequent faecal collections following the pulse-dosed markers. The length of the adaptation and experimental periods will be 4 and 5 days, respectively.
4. P requirements in veal calves fed different rations. The approach taken will depend on the outcome of the pilot. In the case the conventional approach will be used, the number of dietary regimes to be tested will be reduced from 4 to 2. This study will be conducted in a setting similar to study 1 and will last 21 days. In the case of a conventional approach, calves will be subjected to low P diets for 4 days, after which P excretion will be performed for a period of 7 d.

Literature

Dhanoa NS Siddons, RC, France J and Gale DL. 1985. A multicompartment model to describe marker excretion patterns in ruminant faeces. *Br J Nutr* 53: 663-671.

McCue, MD and Welch KC jr. 2016. ^{13}C breath testing in animals: theory, applications and future directions. *J. Comp. Physiol. B* (2016) 186: 265-285.

Van den Borne JJGC, Heetkamp MJW, Buyse J, Niewold TA 2015 Fat coating of Ca butyrate results in extended butyrate release in the gastrointestinal tract of broilers. *Livestock Science* 2015 (175): 96-100.

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

For a description of the studies to be conducted as part of this project, please see the project outline above. Three milestones will be identified within this project, and a 4th one after completion of the animal experiments conducted within this project:

- 1) After study 1 (pilot), a decision will be made on how the fourth study will be conducted, i.e. a within-calf dose response approach or a between calf dose response approach.
- 2) An estimation of passage rate kinetics of MR and concentrates using the isotope method (study 2) and on MR, concentrates and roughages in the faecal collection method (study 3), both focusing on the first compartment of the GI tract (i.e. the rumen for the concentrates and roughages, the abomasum for the MR).
- 3) A validated approach of digesta passage kinetics using a combination of ^{13}C breath test approaches.
- 3) An estimate of P requirements as affected by the nutritional regimes applied in this project.
- 4) Upon completion of the 4 studies, the passage rate data will be used for improvement of the model simulating calf growth from nutritional inputs. P digestion and metabolism will be incorporated into this model, allowing the prediction of total P and N flows from ingestion to growth or excretion via urine or faeces.

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	P requirements in veal calves - a pilot study
2	Passage rate kinetics in veal calves - ^{13}C tracer technique
3	Passage rate kinetics in veal calves - faecal excretion curves
4	P requirements in veal calves fed different rations

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'.	10400	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University	
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 P requirements in veal calves - a pilot study

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 direct goal of this pilot study is to determine whether we can measure the P requirements of individual veal calves using a step-wise within-calf dose response approach. When successful, it provides a more refined technique to determine P requirements under varying nutritional regimes in the future.

As described in section 3.4.1 of the project proposal, the principle of this approach is that after providing an excess of P via MR, P intake will be step-wise reduced via MR (in 7 steps with every step lasting 72h), leading to a reduction of P excreted via urine. The inflection point of the P-excretion curve against P intake will be assessed via nonlinear regression and assumed to represent the requirement of the individual calves. The plateau value, obtained at the lowest P intake will represent the maximum efficiency of P utilization, likely influenced by SF intake.

During this pilot study, we will only monitor the rate of adaptation of urinary P excretion following a substantial reduction in P intake via the MR in a limited number of calves (n=6). If the rate of urinary P excretion stabilizes within 72h after the reduction in dietary P supply, the technique can be considered applicable for individual calves.

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

Six calves of approximately 8 weeks of age will be individually housed in metabolic cages, and fitted with harnesses to which plastic bags are attached for the quantitative collection of faeces. Clean urine can be collected in buckets underneath a funnel, mounted underneath the cage. Calves will be fed a normal ration with a high P milk replacer for the 4-d adaptation period and for the first 3 days of the experimental period, after which they will be switched to a MR lowering the P content of the MR by 20%, which will be fed the remaining 4 days. Typically, if urinary P excretion sensitively responds to a reduction of P intake via MR by 20%, it can be assumed that calves will respond to each of the steps in the within-calf dose response study (i.e. the contrast chosen should not be much larger than the intended change in P intake between two steps).

During the entire experimental period, quantitative, 12h urinary collections, and 24h faecal collections will be performed. This is done to determine the rate of adaptation of urinary P excretion after a reduction in P intake via the MR. In addition, salivary P concentrations will be determined 4 times daily during the experimental period.

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

The number of calves used in this experiment is based on the average P excretion in urine and faeces in several experiments with calves housed under similar conditions. It is based on the analysis of P flows in a study published by Berends et al., (2015), of which the data on P flows are

reported in an internal report by Plomp et al (2015). That study involved 8 calves and used a between-calf dose response approach. A reduction in P input via MR by 15% resulted in a tendency for a reduced P output via urine.

In the present study however, we will use a reduction in P intake of 20% (as described in section 2A - animal procedures). Moreover, we will use a within-calf dose response approach, which will reduce variation. Performing a power analysis (one sided), revealed that at least 6 calves are needed to demonstrate a significant reduction of P excretion via urine when reducing P input by 20%.

We do want to emphasize that with this pilot study we want to determine whether this within-calf dose response approach is applicable to determine the P requirements of individual calves. This will be mainly based on the assessment of the P-excretion curves against P intake via nonlinear regression rather than strict statistical analysis. If we simply cannot find a stabilized urinary P excretion within 72h after the reduction in dietary P supply, we conclude that this within-calf dose response approach does not work.

Literature

Berends, H., van den Borne, J. J. G. C., Røjen, B. A., Hendriks, W. H. & Gerrits, W. J. J. 2015. Effect of protein provision via milk replacer or solid feed on protein metabolism in veal calves. *Journal of Dairy Science*. 98, 2, p. 1119-1126

Plomp M, Gerrits WJJ, Schop TA, Heeres-vd Tol, JJ 2015. Fosforstromen in vleeskalveren. P en Ca balans in kalveren gevoerd met melkvervanger en ruw- en krachtvoer. Rapport Wageningen Livestock Research, 46pp [in Dutch], available on request

B. The animals

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

In this pilot experiment, 6 male Holstein Friesian calves will be used. The age of these calves will be approximately 6 weeks, and we will purchase them from a veal producer or use the calves available at the experimental facilities. Male calves will be used to ease separate collection of faeces and urine. Calves will be about 80 kg of BW at the onset of the trial, and close to 90 kg BW when the trial is finished.

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 male Holstein Friesian calf is the target animal of this project. The rate of adaptation of urinary P excretion to changes in an excess or shortage of phosphorus cannot be estimated in another species. Rumination is essential. Reduction: this pilot study will be performed to investigate the possibility to study P requirements in individual calves rather than the conventional approach in which different levels of P are imposed on different calves, hence necessitating multiple groups of calves, estimating the average requirement of the calf population by regression based on observations obtained from different calves. When possible, less experimental animals are needed to obtain estimates of P requirements under various nutritional regimes. Refinement: As individual housing on metabolism cages causes discomfort, we'll take precautions to minimize the impact. We place pairs of metabolic cages close to each other to facilitate physical contact between two calves. Additionally, we enrich the metabolic cages with brushes, a dry teat for suckling needs, and provide a ball inside the cage. Additionally, the use of chains is minimized (to avoid unnecessary noise). Furthermore, experienced animal care takers will monitor the calves to be sure a potential case of illness or reduced welfare will be diagnosed in an early stage. Handling of the calves will be performed by experienced personnel carefully and quietly, preferably in rest to prevent unnecessary distress. Analgesia and medication are applied where needed. If (in rare cases) analgesia or medication may influence trial results, calves are treated and excluded from the trial. This study also contributes to the refinement of future research determining passage rate kinetics of animals. For example, the duration of the study 'P requirement in veal calves fed different rations' (annex 4) depends on the rate of adaptation of urinary P excretion to changes in P intake via MR. It is important for this study to provide an accurate estimate of this rate of adaptation in order to minimize the duration of the study 'P requirement in veal calves fed different rations' (annex 4), and thus the duration of the individual housing of these calves.

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

Housing on bedding material is not possible as clean urine needs to be collected from underneath the cages. The following measures will be taken to reduce the impact of housing in metabolism cages on welfare of the calves: - use of chains will be minimized as the noise can disturb the calves - availability of brushes, mounted on the cage and a dry teat to satisfy sucking needs - a ball inside the cage - cages will be organized in pairs close to each other to facilitate some physical contact between calves

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.

Based on a literature search within the Pubmed and Scopus database using 'calf, phosphorus requirement, milk replacer, roughage, and concentrate' as searching criteria, we conclude that no study has been published before regarding the P requirements in calves fed a ration based on MR, concentrates and roughages. P requirement studies in beef calves are available, but these calves are fed a ration based on concentrates and roughages without MR, and therefore do not take the potential to recycle P from the MR into account.

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.

Calves will be housed individually in metabolism cages. Fecal collection bags will be harnessed to the calves, to facilitate the quantitative collection of faeces and thereby the quantitative collection of clean urine in buckets underneath funnels, mounted underneath the cage. The dimensions of the cage will be 0.8 x 2m, and calves will be fixed to the front of the cage, allowing them to stand or lie freely. Housing on bedding material is not possible as clean urine needs to be collected from underneath the cages. As individual housing on metabolism cages causes discomfort, we'll take precautions to minimize the impact (i.e., minimized use of chains, cage enrichment including brushes, dry teat, and ball, and cages will be close to each other to facilitate physical contact between calves).

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?

Individual housing for 7 days, restricted movements, no bedding material on the floor, harnesses to fix faecal collection bags.

Explain why these effects may emerge.

Increased occurrence of abnormal oral behaviours (e.g., repetitive self-licking, flank or object sucking, tongue rolling), as calves are deprived from exploring their environment. Some discomfort from wearing harnesses cannot be prevented.

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

The following measures will be taken to reduce the impact of housing in metabolism cages on welfare of the calves: - use of chains will be minimized as the noise can disturb the calves - availability of brushes, mounted on the cage and a dry teat to satisfy sucking needs - a ball inside the cage - cages will be organized in pairs close to each other to facilitate some physical contact between calves

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.

- a calf has feed refusals exceeding 20% of the amount of MR offered for a period exceeding 3 days.
 - a calf has a fever for 3 successive days, not responding to medical treatments proposed by a veterinarian, and signs of infection and inflammation.
 - a calf suffers from problems related to the harness, showing wounds at places the harness is connected.
 - in the expert judgement of the veterinarian, future observations on a calf will not provide reliable results.
 - in the expert judgement of the veterinarian, continuation of the experiment with a calf will cause discomfort higher than foreseen for this trial.
-

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of calves to be removed from the experiment is estimated to be less than 10% during the duration of the trial, based on previous experience in trials of similar duration. The major portion of this 10% is expected to origin from feed refusals due to health problems unrelated to experimental procedures. In addition, problems arising from the harnesses will have a very short duration, as calves will then be removed from the trial.

K. Classification of severity of procedures

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

The level of discomfort is expected to be as listed below: • Individual housing on balance cages, in absence of bedding material during 10 days: moderate • Wearing of harnesses for the collection of faecal collection bags: mild Hence the cumulative discomfort in this trial is estimated at moderate. Based on previous experience, collecting saliva samples are considered to cause no discomfort. We will insert two cotton swabs (150 x 4 mm) into the mouth of a calf, who will chew on them voluntarily, subsequently we will place these into a salivette.

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.

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'.	10400	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University	
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 Passage rate kinetics in veal calves - 13C tracer technique

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

For this study, 48 male, Holstein-Friesian calves will be purchased at about 6 weeks of age. They will be housed in groups and assigned to one of 4 dietary treatments, varying in the intake of solid feed (SF) and MR (factor 1) and the concentrate:roughage ratio within the SF (factor 2) in 2x2 factorial arrangement. The calves will be adapted to their diets for a period of 5 weeks to allow rumen development and rumination behaviour to completely adjust to the levels and composition of SF intake. After that, calves will be housed for 7 days in pairs in one of 4 respiration chambers, and frequently fed (i.e. 6x daily) their SF portion while receiving their MR supply twice daily.

This setup (pair or calves in one of 4 respiration chambers), results in a staggered planning with 6 batches of 8 calves (4 pairs) undergoing the same experimental procedure, each batch starting one week after the previous one. In this way, creating a range in age (as also described in section 3.4.1 - research strategy of the project proposal). The first batch of 8 calves will adapt to their diet for 5 weeks, subsequently followed by 7 days of measurements in the respiration chambers. The second batch of calves (also n=8) will adapt to the diet for 6 weeks (i.e., basis of 5 weeks + the 7 days that the first group of calves in housed in respiration chambers), subsequently followed by 7 days of measurements in the respiration chambers. This pattern continues for all 6 batches. In this manner, observations are achieved over an age range of 6 weeks.

When the calves are housed in the respiration chambers, every two days, one of the MR or SF meals will be spiked with a ^{13}C stable isotope tracer, measuring the kinetics of recovery in $^{13}\text{CO}_2$ in exhaled air as a measure of the rate of ruminal fermentation and/or digesta passage kinetics. ^{13}C tracers will be selected after a thorough search of literature, but likely include naturally labelled yeast proteins (to be included in the concentrate), ^{13}C -glycine (to be included in the MR), ^{13}C octanoate and ^{13}C - NaHCO_3 , to be injected intravenously. The latter is intended to correct for a delay between nutrient oxidation and ^{13}C exhaled in breath. $^{13}\text{CO}_2$ excretion will be measured on-line in the facilities for indirect calorimetry of Wageningen University.

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

During the 5-week adaptation period, calves will be housed in groups (divided over several departments within the experimental facilities) and fed diets according to the experimental schedule. MR will be provided twice daily and SF will be provided in two portions upon completion of MR intake. During the 7d experimental period, calves will be housed in pairs inside a climatized respiration chamber. During this week, continuous measurement of CO_2 , $^{13}\text{CO}_2$ and CH_4 production and the consumption of O_2 will be performed. During this period, SF will be provided in 6 equal portions spread over the 24h period. Following oral administration of ^{13}C tracers, patterns of $^{13}\text{CO}_2$ excretion will be measured. To account for a delay in $^{13}\text{CO}_2$ exhalation following arrival in the bicarbonate pool, $^{13}\text{CO}_2$ excretion patterns will be analyzed following intravenous injection of a bolus ^{13}C - NaHCO_3 .

After the 7 days in the climate respiration chambers, the calves will directly in the study described in Annex 3.

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

This experiment is designed to quantify differences between the dietary treatments on digesta passage rate kinetics. As calves are housed in pairs and the gaseous exchanged is measured in a respiration chamber, a pair is considered as the experimental unit for this study. Treatment differences on dependent variables (mostly time of peak recovery of $^{13}\text{CO}_2$ after a bolus of ^{13}C tracer) will be analyzed by ANOVA using the dietary contrasts as fixed effects. In a previous study (Berends et al., 2015) it was demonstrated that provisional estimates of ruminal fractional passage rates could be evaluated using 8 calves per treatment, applying an approach using indigestible markers. A significant difference could be detected for a difference in feeding level of SF, similar to the one intended for this study. Considering a reduction in variation with two calves per experimental unit, we consider 6 experimental units for each treatment combination to be sufficient to estimate the effect of our dietary treatments on passage rate kinetics. For the methodology applied in this study, estimates of variation between experimental units are not available, although the $^{13}\text{CO}_2$ breath test has been applied previously in calves in our facilities (see e.g. Gilbert et al., 2016), also with 2 calves in a respiration chamber. A 3-h difference in the time of peak metabolism of fructose and glucose could be quantified using 5 pairs of calves per treatment ($P < 0.01$). Six pairs of calves per treatment combination would enable us to significantly detect a 2h difference in the time of peak of $^{13}\text{CO}_2$ recovery.

Literature

Berends, H., van den Borne, J. J. G. C., Røjen, B. A., Hendriks, W. H. & Gerrits, W. J. J. 2015b. Effect of protein provision via milk replacer or solid feed on protein metabolism in veal calves. *Journal of Dairy Science*. 98, 2, p. 1119-1126.

Gilbert, M. S., Pantophlet, A. J., van den Borne, J. J. G. C., Hendriks, W. H., Schols, H. A. & Gerrits, W. J. J. 2016. Effects of replacing lactose from milk replacer by glucose, fructose, or glycerol on energy partitioning in veal calves. *Journal of Dairy Science*. 99, 2, p. 1121-1132

B. The animals

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

Male, Holstein Friesian calves are the target animals for the objective of this study.

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 male Holstein Friesian calf is the target animal of this project. Passage rate kinetics measured in other ruminants animals are not applicable for calves, because based on the results obtained by Berends et al. (2015) it can be concluded that the passage rate of digesta in calves is likely substantially lower compared with other ruminants. Reduction: the objective of this study is to evaluate the possibility to use minimally invasive ¹³C breath test approach for the measurement of passage rate kinetics in calves. Outcomes will be validated with more conventional measures of passage rate kinetics (annex 3 of this project). When successful, this approach can be used for repeated measurement of digesta passage rate in calves, or potentially also in other ruminant species. Refinement: Calves will be socially housed during the adaptation period and will be housed in pairs in the respiration chambers to avoid social isolation. We intent to use free housing, but if needed we restrain the calves during feeding. Measurements will be non-invasive, with the only exception of an intravenous injection of ¹³C labelled NaHCO₃. Furthermore, experienced animal care takers will monitor the calves to be sure a potential case of illness or reduced welfare will be diagnosed in an early stage. Handling of the calves will be performed by experienced personnel carefully and quietly, preferably in rest to prevent unnecessary distress. Analgesia and medication are applied where needed. If (in rare cases) analgesia or medication may influence trial results, calves are treated and excluded from the trial.

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

No adverse effects are foreseen

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.

Based on a literature search within the Pubmed and Scopus database using 'calf, passage rate kinetics, milk replacer, roughage, and concentrate' as searching criteria, we conclude that no study has been published that uses the 13C tracer technique to measure digesta passage rate kinetics in calves fed combination of MR and solid feed are available. Hence this is not a repeat of research of others.

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.

Calves will be socially housed during the adaptation period and will be housed in pairs in the respiration chambers to avoid social isolation. We intent to use free housing, but if needed we will restrain the calves during feeding. In the respiration chambers, two calves will be housed in a pen of about 1.80x 3.5m. This is related to the maximum inner measures of the respiration chambers and needed for accurate measurement of short-term changes in 13CO2 exhalation.

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?

We do not expect other adverse effects, including of the different dietary treatments. The four dietary treatments, varying in the intake of SF and MR (factor 1) and the concentrate:roughage ratio within the SF (factor 2), will be within the range which is fed in practice.

Explain why these effects may emerge.

n.a.

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

n.a.

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.

Not as a result of the animal procedures, but health problems may arise necessitating animals to be removed from the trial. Humane endpoints are:
- feed refusals exceeding 20% of the daily allowance for a period exceeding 3 days - a calf has a fever for 3 successive days, not responding to medical treatments proposed by a veterinarian. - in the expert judgement of the veterinarian, future observations on a calf will not provide reliable results. - in the expert judgement of the veterinarian, continuation of the experiment with a calf will cause discomfort higher than foreseen for this trial.

Indicate the likely incidence.

Likely 5% or less, because the calves are housed socially during the adaptation period and in pairs in the respiration chambers. Moreover, we intent to house the calves freely (not restrained, with the possible exception during feeding).

K. Classification of severity of procedures

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

The level of discomfort is expected to be as listed below: • Group housing in adaptation phase and in respiration chambers, in absence of bedding material during 7 days: mild • if needed calves will be restrained during feeding: mild • iv injection of a pulse dose of NaHCO₃: mild • weighing of the calves (weekly): mild Hence the cumulative discomfort in this trial is estimated at mild.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

L. Method of killing

No > Continue with Section 3: 'Signatures'.

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

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'.	10400	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University	
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 Passage rate kinetics in veal calves - faecal excretion curves

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

For this study, 48 male, Holstein-Friesian calves will be re-used from the study described in annex 2. The experimental procedures are staggered, with measurements on every batch of 8 calves starting a week after the previous one. The results from this study will thus be obtained over an age range of 6 weeks.

Upon completion of the study described in annex 2, the calves remain housed in pairs. They will be fed the same experimental dietary treatments, varying in the intake of solid feed (SF) and MR (factor 1) and the concentrate:roughage ratio within the SF (factor 2) in 2x2 factorial arrangement. The calves then have already been adapted to these diets for at least 6 weeks. Calves will be fitted with harnesses to which plastic bags are attached for the quantitative collection of faeces. Three indigestible markers will be used to trace the concentrates (likely TiO₂ or alkanes), roughage (likely cr-mordant long straw) and the MR (likely Co-EDTA). The markers will be administered in a pulse dose 48h (roughage), 24h (concentrate) or 4h (MR) prior to the start of the faecal collection period. Faecal bags will be checked bi-hourly for a period of 4 days, and marker excretion will be quantified in time. Following methods published by Dhanoa et al. (1985), faecal excretion curves of markers will be analyzed to estimate the overall mean retention time of digesta and the passage rate of the slowest compartment (rumen for the markers of the concentrate and roughage; abomasum for the markers of the MR).

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

Calves will be housed in pairs, and fitted with a harness to which faecal collection bags will be attached. If the combination of housing in pairs and the harnesses is not successful, we will place a fence in between the calves. We will restrain calves during replacement of the faecal collection bags and, if needed, also during feeding.

Calves will be fed according to normal procedures and faeces will be collected 2-hourly during 4 days after the start of the trial.

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

As described in annex 2 and 4, we need 48 calves to achieve the objectives of these trials. Results from this study will be compared with the results

from the study described in annex 2 (passage rate kinetics - 13C tracer technique) and therefore needs to be conducted with the same calves continued on the same treatments.

B. The animals

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

Male, Holstein Friesian calves are the target animals for the objective of this study.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Discomfort during previous experiment (described in annex 2 of this project) is classified as mild. The comparison of the results of annex 2 with the results of this study is important, having similar conditions and working with the same calves is preferred. Additionally, if we would be working with a new batch of calves, we hope to adapt these calves to the diets for several weeks. This is not necessary if we re-use the calves from Annex 2.

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 male Holstein Friesian calf is the target animal of this project. Passage rate kinetics measured in other species are not applicable for calves, because based on the results obtained by Berends et al. (2015) it can be concluded that the passage rate of digesta in calves is lower compared with other species. **Reduction:** the objective of this study is to estimate mean retention time of digesta and passage rate in the rumen, and secondly to provide a reference for the minimally invasive 13C breath test approach for the measurement of passage rate kinetics in calves, described in the study of annex 2. Using the same calves of the study described in annex 2, we reduce the total number of calves needed. **Refinement:** After careful consideration, it is decided to avoid the use of metabolism cages in this study. Therefore, the calves will be housed in pairs. We intent to house the calves in pairs while they are fitted with harnesses. If is questionable whether this possible, because it might be that the calves will start interacting with the harness of the other calf. If all goes well, we continue housing them in pairs. If the housing in pairs in combination with the harnesses does not work, we will place a fence within their pen. Calves will be harnessed but will only be fixed when the faecal collection bags need to be replaced. We intent to use free housing, but if needed we restrain the calves during feeding. Furthermore, experienced animal care takers will monitor the calves to be sure a potential case of illness or reduced welfare will be diagnosed in an early stage. Handling of the calves will be performed by experienced personnel carefully and quietly, preferably in rest to prevent unnecessary distress. Analgesia and medication are applied where needed. If (in rare cases) analgesia or medication may influence trial results, calfs are treated and excluded from the trial.

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

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Based on a literature search within the Pubmed and Scopus database using 'calf, passage rate kinetics, milk replacer, roughage, and concentrate' as searching criteria, we conclude that no study has been published in which digesta passage rate kinetics has been measured in calves fed combination of MR and solid feed are available. Hence this is not a repeat of research of others.

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?

F. Accommodation and care

No

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

Calves will be housed in pairs in a pen size meeting the EU directive. Calves will be harnessed, but will only be fixed when the faecal collection bags need to be replaced. If housing in pairs with calves that are harnessed is not possible, a fence will be placed in between the calves. We intent to use free housing, but if needed we restrain the calves during feeding. Bedding material cannot be used as the possible consumption can alter digesta passage rates.

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?

Harnesses to fix faecal collection bags, fixing the calves when switching the faecal collection bags, the possible restraintment during feeding, and the possible individual housing if calves interfere with eachothers harness.

Explain why these effects may emerge.

Some discomfort from wearing harnesses cannot be prevented. In addition, fixing the calves at times of changing the faecal collection bags as well as restraining the calves during feeding will cause some discomfort. Moreover, the possible restraintment during feeding (when eating from eachothers food) and the possible individual housing (when interfering with eachothers harness), will cause some discomfort.

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

Harnesses will be checked daily and adjusted if needed. Fixing calves at the time of changing faecal collection bags is needed, but as opposed to housing on metabolism cages, it allows calves to move around freely when not fixed.

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.

- a calf has feed refusals exceeding 20% of the amount of MR offered for a period exceeding 3 days.
 - a calf has a fever for 3 successive days, not responding to medical treatments proposed by a veterinarian.
 - a calf suffers from problems related to the harness, showing wounds at places the harness is connected.
 - in the expert judgement of the veterinarian, future observations on a calf will not provide reliable results.
 - in the expert judgement of the veterinarian, a calf is not fit/happy/healthy (reduced welfare) without affecting experimental results.
-

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of calves to be removed from the experiment is estimated at less than 10% during the duration of the trial. The major portion of this 10% is expected to origin from feed refusals due to health problems unrelated to experimental procedures. In addition, problems arising from the harnesses will have a very short duration, as calves will then be removed from the trial

K. Classification of severity of procedures

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

The level of discomfort is expected to be as listed below: • Housing in pairs, or individually, fixing at the time of changing faecal collection bags during 7 days: mild • Wearing of harnesses for the collection of faecal collection bags: mild Hence the cumulative discomfort in this trial is estimated as mild.

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.

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'.	10400				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University				
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="622 880 815 904">Serial number</th> <th data-bbox="1357 880 1697 904">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="622 912 640 936">4</td> <td data-bbox="1357 912 2024 936">P requirements in veal calves fed different rations</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	4	P requirements in veal calves fed different rations
Serial number	Type of animal procedure					
4	P requirements in veal calves fed different rations					

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The objective of this trial is to estimate minimal P requirements for growth of calves fed different mixtures of solid feed and milk replacer. There are two options for this trial, depending on the outcome of the pilot (annex 1). When the rate of adaptation of urinary P excretion following a substantial reduction in P intake via the MR stabilizes within 72 h after the reduction in dietary P supply, the technique can be considered applicable for individual calves. If this is the case, a within-calf response dose technique can be used to estimate P requirement for individual calves, in analogy to the dose response approach to estimate amino acid requirements, described by Kampman-van de Hoek (2013). If the results of the pilot demonstrate that more time is needed for urinary P excretion to stabilize, a more traditional, between animal, dose-response approach will be used (see e.g. Erickson et al., 2002), comparing P excretion at different levels of intake between animals.

The age of the calves at the start of the measurements in this experiment will range from 13 weeks of age to 18 weeks of age, depending on the batch of calves. This is needed because of the simultaneous availability of 4 climate-respiration chambers for the study described in annex 2 (calves are re-used). In each batch, 8 calves will be used. During the 6 batches, measurements on 48 calves are obtained. Hence differences between batches represent a composite effect of time, age and batch of calves.

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

Option 1: within-calf dose response approach

Upon completion of the study described in annex 3 of this project, calves will remain on their 4 nutritional treatments, but transferred to a MR with a high P level. All calves will be housed individually on metabolism cages. Calves will be fitted with harnesses to allow quantitative collection of faeces and collection of clean urine from funnels mounted underneath the cage. P intake via the MR will be reduced in a step-wise manner in 7 steps of 3d each (21d in total). Faecal P excretion will be measured daily, and urinary excretion in 12h periods. The response of total and urinary P excretion to a reduction in P intake will be analyzed using nonlinear regression techniques to estimate the inflection point (see Kampman-van de Hoek et al., 2013), which can be considered the minimum P requirement for each calf. Effects of the nutritional treatments on the estimated P requirements will be analyzed.

With this option, the calves will be followed for 21d in total. It could be that the minimum P requirement of a calf is reached before that (e.g., step 5 at 15 days or with step 6 at 18 days). However, the faecal and urine samples will be analyzed in the laboratory after the experiment. Therefore, we are unable to determine the minimum P requirement while the experiment is running, thus each calve has to be followed for 21d.

Option 2: between calf dose response approach

Upon completion of the study described in annex 3 of this project, calves will remain housed in pairs for two weeks and transferred to two dietary treatments: i.e. two levels of SF intake at a fixed roughage: concentrate ratio. Hence there will be 24 calves on each SF treatment. Within each SF treatment, calves will be assigned to a MR with one of 6 P concentrations, varying from low (at 50% of the estimated requirements) to high (at 150% of the estimated requirements). Thus, there will be 4 calves assigned to each P level within the SF treatment. Calves will then be housed individually on metabolism cages. Calves will be fitted with harnesses to allow quantitative collection of faeces and collection of clean urine from funnels mounted underneath the cage. Faecal and urinary P excretion will be quantified of the complete 7d collection period. The response of total and urinary P excretion to a increasing P intake will be analyzed using nonlinear regression techniques to estimate the inflection point. In this way, one estimate will be obtained for each SF treatment,

Literature

Erickson GE, Klopfenstein TJ, Milton CT, Brink D, Orth MW and Whitted KM. 2002. Phosphorus requirements of finishing feedlot calves. *J. Anim., Sci.* 80(6) 1690-1695.

Kampman-van de Hoek, E, Gerrits, WJJ, van der Peet-Schwering, CMC Jansman, AJM and van den Borne, JJGC 2013. A simple amino acid dose-response technique to quantify amino acid requirements of individual meal-fed pigs *Journal of Animal Science*. 91, 10, p. 4788-4796

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

Depending on the option chosen, there will be one estimate of P requirements per calf, or one per SF treatment. Between-calf variation of such estimates are unknown, but previous experience using a similar dose response approach for amino acid requirements in pigs (Kampman van de Hoek et al, 2013; Bruininx et al., 2015) and for responses to graded levels of starch or starch products in calves (Gilbert et al., 2015) demonstrate sensitive responses to step-wise changes in the driving variable using 10 animals/treatment.

For estimating P requirements using a between-calf approach, 24 calves per treatment assigned to graded levels of P intake is an approach

previously shown to provide accurate P requirements, and can be expected to be adequate to develop reliable requirement estimates for our two nutritional conditions.

Literature

Bruininx, E. M. A. M., van den Borne, J. J. G. C., Eising, I., Vervenne, P., Sakkas, P. & Gerrits, W. J. J. 2015. Optimal lysine:DE ratio in growing pigs is independent of starch or fat as main energy source at two energy intake levels *Journal of Animal Science*. 93, 10, p. 4774-4780

Gilbert, M. S., van den Borne, J. J. G. C., Berends, H., Pantophlet, A. J., Schols, H. A. & Gerrits, W. J. J. 2015. A titration approach to identify the capacity for starch digestion in milk-fed calves. *Animal*. 9, 2, p. 249-257

B. The animals

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

In this experiment, 48 male Holstein Friesian calves will be re-used from the study described in annex 2 and 3 of this project. Male calves will be used to ease separate collection of faeces and urine.

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.

Discomfort during the previous experiment was considered mild. The interest in this project is in the same treatments imposed on calves of annex 2, 3, and 4, facilitating repeated measurements.

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 male Holstein Friesian calf is the target animal of this project. Effects of SF intake and composition on P requirements cannot be estimated in vitro or in model animal species. Reduction: Depending on the results of the pilot study (i.e. when a within-calf titration approach appears feasible), this study contributes to a reduction in the number of calves needed to obtain estimates of P requirements under various nutritional conditions. Refinement: The duration of the dose response study depends on the rate of adaptation of urinary P excretion to changes in P intake via MR. If changes in urinary P excretion following a reduction in P intake via the MR adapt within 48 hours, the duration of the dose response study can be reduced from 21 to 14 d, and thus reducing the duration of the individual housing of these calves. As individual housing on metabolism cages causes discomfort, we'll take precautions to minimize the impact. We place pairs of metabolic cages close to each other to facilitate physical contact between two calves. Additionally, we enrich the metabolic cages with brushes, a dry teat for suckling needs, and provide a ball inside the cage. Additionally, the use of chains is minimized (to avoid unnecessary noise). Furthermore, experienced animal care takers will monitor the calves to be sure a potential case of illness or reduced welfare will be diagnosed in an early stage. Handling of the calves will be performed by experienced personnel carefully and quietly, preferably in rest to prevent unnecessary distress. Analgesia and medication are applied where needed. If (in rare cases) analgesia or medication may influence trial results, calves are treated and excluded from the trial.

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

Housing on bedding material is not possible as clean urine needs to be collected from underneath the cages. The following measures will be taken to reduce the impact of housing in metabolism cages on welfare of the calves: - use of chains will be minimized as the noise can disturb the calves -

availability of brushes, mounted on the cage and a dry teat to satisfy sucking needs - a ball inside the cage. - cages will be organized in pairs close to each other to facilitate some physical contact between calves

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.

Based on a literature search within the Pubmed and Scopus database using 'calf, phosphorous requirement, milk replacer, roughage, and concentrate' as searching criteria, we conclude that no study has been published that measured P requirements in calves fed combination of MR and solid feed are available. Hence this is not a repeat of research of others. P requirement studies in beef calves are available, but these calves are fed a ration based on concentrates and roughages without MR, and therefore do not take the potential to recycle P from the MR into account.

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.

Calves will be housed individually in metabolism cages. Fecal collection bags will be harnessed to the calves, to facilitate the quantitative collection of faeces and thereby the quantitative collection of clean urine in buckets underneath funnels, mounted underneath the cage. The dimensions of the cage will be 0.8 x 2m, and calves will be fixed to the front of the cage, allowing them to stand or lie freely.

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.

G. Location where the animals procedures are performed

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?

Prolonged individual housing, Restricted movements, no bedding material on the floor, harnesses to fix faecal collection bags. Please note: we are aware that in some occasions the calves receive a diet well below the P requirement. In comparison with studies performed with pigs, as well as the duration of the experiment, we do not consider this as a cause of discomfort. We do however acknowledge the risk, and will assess the calves daily to see the development of P deficiency symptoms in an early stage. After this experiment had ended, all calves will be fed the high P MR.

Explain why these effects may emerge.

Increased occurrence of abnormal oral behaviours (e.g., repetitive self-licking, flank or object sucking, tongue rolling), as calves are deprived from exploring their environment due to a relative long period of individual housing in metabolic cages. Some discomfort from wearing harnesses cannot be prevented.

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

Housing on bedding material is not possible as clean urine needs to be collected from underneath the cages. The following measures will be taken to reduce the impact of housing in metabolism cages on welfare of the calves: - use of chains will be minimized as the noise can disturb the calves - availability of brushes, mounted on the cage and a dry teat to satisfy sucking needs - a ball inside the cage. - cages will be organized in pairs close to each other to facilitate some physical contact between calves After this experiment had ended, all calves will be fed a diet which had a P content equal or above P requirements.

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.

- a calf has feed refusals exceeding 20% of the amount of MR offered for a period exceeding 3 days.
 - a calf has a fever for 3 successive days, not responding to medical treatments proposed by a veterinarian, and signs of infection and inflammation.
 - a calf suffers from problems related to the harness, showing wounds at places the harness is connected.
 - a calf which clearly suffers from P deficiency (occurrence of symptoms like bone fractures).
 - in the expert judgement of the veterinarian, future observations on a calf will not provide reliable results.
 - in the expert judgement of the veterinarian, continuation the experiment for a calf will cause more discomfort than foreseen.
-

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of calves to be removed from the experiment is estimated at about 15% during the duration of the trial. The major portion of this 15% is expected to origin from feed refusals due to health problems unrelated to experimental procedures. In addition, problems arising from the harnesses will have a very short duration, as calves will then be removed from the trial. The higher incidence compared with the study described in annex 1 is related to the longer duration of this trial.

K. Classification of severity of procedures

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

The level of discomfort is expected to be as listed below: • Individual housing on balance cages, in absence of bedding material during 21 days: moderate • Wearing of harnesses for the collection of faecal collection bags: mild • Exposure to a P deficient diet for a period of about 10 days: moderate Hence the cumulative discomfort in this trial is estimated at moderate.

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.

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

Wageningen University



Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD104002017874

Bijlagen

2

Datum 20 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 17 februari 2017. Het gaat om uw project "Influence of solid feed intake on digesta passage rate and phosphorus requirements of veal calves". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD104002017874. 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:

20 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD104002017874

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
20 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD104002017874

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10400
Naam instelling of organisatie: Wageningen University
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 9215846
Straat en huisnummer: Akkermaalsbos 12
Postbus: 59
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN
IBAN: NL10RABO0397066465
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Wageningen UR

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Onderzoeker
Afdeling: [REDACTED]
Telefoonnummer: [REDACTED] 6
E-mailadres: [REDACTED]

Datum:
20 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD104002017874

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 mei 2017
Geplande einddatum: 30 november 2017
Titel project: Influence of solid feed intake on digesta passage rate and phosphorus requirements of veal calves
Titel niet-technische samenvatting: invloed van ruw- en krachtvoer op fosforbehoefte vleeskalveren
Naam DEC: DEC WUR
Postadres DEC: Postbus 9101, 6700 HB Wageningen
E-mailadres DEC: dec@wur.nl

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

Ondertekening

Naam: [REDACTED]
Functie: [REDACTED]
Plaats: Wageningen
Datum: 17 februari 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University and Research Concernstaf+
t.a.v. Crediteurenadministratie
Droevendaalsesteeg 4
6708 PB WAGENINGEN


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD104002017874
Bijlagen
2

Datum 20 februari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 20 februari 2017
Vervaldatum: 22 maart 2017
Factuurnummer: 170874
Ordernummer: WUR1037014

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD104002017874	€ 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.

Van: DEC WUR <dec@wur.nl>
Verzonden: maandag 27 maart 2017 11:42
Aan: 'info@zbo-ccd.nl'
Onderwerp: RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag
AVD104002017874

Categorieën: Dossier: [REDACTED]

Geachte [REDACTED]

In het advies, dat u van de DEC heeft ontvangen is helaas een passage weggevallen. Excuus hiervoor. T.a.v. onderstaand punt heeft de DEC geoordeeld, dat zij dit acceptabel acht, zeker gezien het feit dat de metingen noodzakelijk zijn in het kader van dit project. De dieren worden in principe in groepen gehuisvest, als ze individueel worden gezet is dit zo kort mogelijk. De onderzoekers ondervangen een toename in ongerief door het gezamenlijk (in paren) huisvesten en het aanbieden van extra verrijking.

Ik hoop hiermee uw vraag te hebben beantwoord.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Secretaris Dierexperimentencommissie
Wageningen University & Research

tel. [REDACTED]

<http://www.wageningenur.nl/>

Bezoekadres:
Droevendaalsesteeg 4
[REDACTED]

Postadres:
[REDACTED]
Postbus 9101
6700 HB Wageningen

Intern postadres:
Bode 75

Kantooruren: maandag, dinsdag, donderdag, 9.00-17.00 u

Disclaimer

Dit bericht is uitsluitend bestemd voor geadresseerde. Het bericht kan vertrouwelijke informatie bevatten. Gebruik door derden of openbaarmaking van dit bericht zonder toestemming van de afdeling Corporate Governance & Legal Services is niet toegestaan. Als u dit bericht per abuis heeft ontvangen, wordt u verzocht het te vernietigen en ons te informeren.

From: info@zbo-ccd.nl [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]

Sent: Friday, March 24, 2017 12:26 PM

To: DEC WUR

Subject: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag AVD104002017874

Geachte DEC WUR,

Op 17-02-2017 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Influence of solid feed intake on digesta passage rate and phosphorus requirements of veal calves' met aanvraagnummer AVD104002017874.

In uw advies geeft u aan dat de dieren niet gehuisvest en verzorgd worden volgens bijlage III van de richtlijn. Kunt u ook aangeven of dit voldoende is onderbouwd en uw antwoord toelichten?

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

Met vriendelijke groet,


Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl

**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'.	10400
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University
1.3 Provide the title of the project.	Influence of solid feed intake on digesta passage rate and phosphorus requirements of veal calves

2 Categories

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

Higher education or training

Forensic enquiries

Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Veal calves are traditionally fattened on a diet consisting only of milk replacer (MR). From a welfare and economic perspective, there is a strong incentive to replace a considerable portion of the MR by solid feeds (SF) in the diet (see e.g. Webb et al., 2015). Therefore, SF comprising roughages and concentrates, represent an increasingly important source of nutrients for veal calves. However, veal calves will still be fed a proportion of MR in their diet for approximately 9 months of age to achieve the paleness of white veal meat.

Interactions between MR and SF, mostly occurring in the gastro-intestinal tract, complicate the prediction of the nutritional value of these ration components. Quantitative information about passage rate kinetics of SF through the rumen and other gastro-intestinal compartments currently hampers progress in this field. Limited information available (Berends et al., 2015a) indicates that the level of SF feeding affects ruminal passage rates, more so for concentrates compared with straw, with estimates of mean retention time being considerable higher than in calves exclusively fed on SF. This impacts the nutritional value of SF and also the potential of nutrient recycling via the rumen. Studies for measuring passage rate kinetics traditionally involve recovery of indigestible tracer inside various compartments of the gastro-intestinal tract (e.g. Berends et al. 2015a), or faecal excretion curves of indigestible markers. These techniques involve sacrificing experimental animals, thus preventing repeated measures on a subject, and/or individual housing on balance cages. Novel technologies to measure passage rate kinetics include the measurement of recovery of ¹³C tracers in breath (e.g. McCue and Welch, 2016) but these techniques have not been tested and validated in calves.

Recycling of nutrients from the MR back into the rumen has been demonstrated for nitrogen in many types of ruminant animals, including veal calves (Berends et al., 2014, 2015b). Also for phosphorus (P), recycling from blood, via saliva, back into the rumen has been demonstrated to occur in ruminants. Like with nitrogen, exploiting this potential can contribute to the P economy of the calf. Typically, MR ingredients are rather rich in P. Upon consumption, MR flows directly to the abomasum, i.e. bypassing the rumen, and from there to the small intestine. P absorbed from the MR thus enters the systemic circulation. Through saliva, P can recycle back into the rumen, thus providing P originating from MR with a second chance to be utilized. Currently, P contents of the SF portion of the veal calf diet are not optimized to take this type of recycling into account. Hence there is an opportunity to reduce the P content of SF, thereby contributing to steering or reducing in P excretion into the environment. For the Netherlands, a reduction of P excretion is vital to arrive below the maximum set by EU regulations.

Literature

Berends, H., van den Borne, J. J. G. C., Røjen, B. A., van Baal, J. & Gerrits, W. J. J. 2014. Urea Recycling Contributes to Nitrogen Retention in Calves Fed Milk Replacer and Low-Protein Solid Feed. *The Journal of Nutrition*. 144, 7, p. 1043-1049

Berends, H., van den Borne, J. J. G. C., Stockhofe-Zurwieden, N., Gilbert, M. S., Zandstra, T., Pellikaan, W. F., van Reenen, C. G., Bokkers, E. A. M. & Gerrits, W. J. J. 2015a. Effects of solid feed level and roughage-to-concentrate ratio on ruminal drinking and passage kinetics of milk replacer, concentrates, and roughage in veal calves. *Journal of Dairy Science*. 98, 8, p. 5621-5629

Berends, H., van den Borne, J. J. G. C., Røjen, B. A., Hendriks, W. H. & Gerrits, W. J. J. 2015b. Effect of protein provision via milk replacer or solid feed on protein metabolism in veal calves. *Journal of Dairy Science*. 98, 2, p. 1119-1126.

McCue, MD and Welch KC jr. 2016. ¹³C breath testing in animals: theory, applications and future directions. *J. Comp. Physiol. B* (2016) 186: 265-285.

Webb, L. E., van Reenen, C. G., Berends, H., Engel, B., de Boer, I. J. M., Gerrits, W. J. J. & Bokkers, E. A. M. 2015. The role of solid feed amount and composition and of milk replacer supply in veal calf welfare. *Journal of Dairy Science*. 98, 8, p. 5467-5481

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?

In this project, we will address three important research questions:

- 1) Can digesta passage rate kinetics in calves (with emphasis on the rumen) be measured using non-invasive ¹³C tracer breath test approach?
- 2) What is the effect of SF intake and roughage to concentrate ratio on passage rate kinetics of MR and concentrates
- 3) What are the P requirements of calves fed rations with different MR to SF ratios and different SF compositions (i.e., different concentrate to roughage ratios).

The underlying issue of the latter 2 questions is to what extent can we exploit P recycling as a mechanism to steer/reduce P excretion in veal calves fed combinations of SF and MR.

This project is achievable, both in terms of the technical aspect and the scientific aspect. This is due to the fact that this project involves project members with expertise and knowledge on this topic as well as on the practicability of the experiments. This enables us to design the experiments, which are described in more detail in the appendices, in such a way that we can answer the above mentioned questions while minimizing animal discomfort as much as possible.

3.3 Relevance

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

Inside the various compartments of the gastro-intestinal tract, there is always competition between passage and degradation of macronutrients. With increasing passage rate within a compartment, time for degradation decreases, hence reducing the efficiency of nutrient digestion in that compartment. Depending on the rate of feed intake, this reduced efficiency may lead to a decrease in nutrient absorption or not. For predicting the feeding value of MR, concentrates and roughages (together comprising the SF component of the diet) it is pivotal to know passage rate kinetics. Such information typically is integrated into mathematical models predicting nutrient absorption following the provision of various dietary regimes. Such models are already available for pigs, dairy cows and for calves fed exclusively on milk replacers. Currently, a calf model is being developed integrating rumen development, rumen function and post-absorptive nutrient metabolism. This model will be used for designing and evaluation of feeding strategies in veal calves, fed various combinations of MR and SF. Reliable information about passage rate kinetics of the different ration components has been identified as limiting the quality of such models. Current approaches to the measurement of passage rate kinetics involve the use of indigestible marker techniques, either requiring prolonged individual housing, or sacrificing of experimental animals, the latter preventing repeated measures on a subject. Novel, minimally invasive, $^{13}\text{CO}_2$ breath test approaches could, in part, replace such approaches, but need to be developed and tested.

Reducing P excretion in the environment has been identified as an important target by the Dutch government, as P excretion has exceeded the limits set by EU in 2015. For extending the derogation for 2017 and beyond, prevention of P excretion exceeding these limits is of utmost importance. Furthermore, reducing P inputs (via dietary manipulation) will also contribute to a sustainable use of resources. This research will contribute positively to control both P inputs and P excretion. First, as mentioned previously, MR ingredients are rather rich in P. This, combined with the recycling of P in the rumen, provides the opportunity to reduce the P content of SF, thus reducing P inputs. Second, by determining the P requirements of calves, we are able to control the P excretion. Third, integrating knowledge into mathematical models will allow more accurate predictions of nutrient use and environmental excretion under widely varying nutritional regimes. Moreover, this research will contribute to less invasive measurements (increased refinement) of passage rate kinetics in future experimental animals.

3.4 Research Strategy

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

Within the present project we aim to quantify passage rate kinetics of MR, concentrates and roughages under 4 different dietary regimes. We will also determine P requirements in calves under the same 4 dietary regimes. As adaptation of calves to these dietary regimes will take time (about 4 weeks), we will minimize the number of calves required by performing a series of experiments, using the same calves. First, a pilot experiment will be performed (see section 3.4.2 and annex 1) to determine whether P requirements can be determined for individual calves with a step-wise within animal dose response approach, similar to Kampman van de Hoek et al. (2012) for studying limiting amino acids in pigs. The principle of the

technique is that after providing an excess of P via MR, the P intake will be reduced via MR, leading to a reduction of P excreted via urine. The inflection point of the P-excretion curve against P intake will be assessed via nonlinear regression and assumed to represent the requirement of that calf. The plateau value, obtained at the lowest P intake will represent the maximum efficiency of P utilization, likely influenced by SF intake. The advantage of such a technique is that it potentially provides estimates of P requirements of individual calves. For the pilot study, only the rate of adaptation of urinary P excretion following a substantial reduction in P intake via the MR will be monitored in a limited number of calves. If the rate of urinary P excretion stabilizes within 72h after the reduction in dietary P supply, the technique can be considered applicable for individual calves. If this is the case, the different dietary regimes will be imposed on calves, subsequently followed by two studies to investigate passage rate kinetics of MR, concentrates and roughages (see section 3.4.2 and both annex 2 and 3), followed by a study to quantify P requirements under these nutritional conditions in each calf (see section 3.4.2 and annex 4). If the within-calf dose response technique does not work, a more traditional, between animal, dose response approach will be used (see e.g. Erickson et al., 2002), comparing P excretion at different levels of intake between animals. Hence, this project comprises 4 studies, with studies 2, 3, and 4 (annex 2, 3, and 4, respectively) being performed with the same calves. The calves in the pilot study (annex 1) will be about 6 to 8 weeks of age. The age of the calves at each of the 3 consecutive studies (annex 2, 3, and 4) will differ, as these studies are performed sequentially, (re-)using the same 48 calves. These studies will be performed in six batches. At start of the first passage rate kinetics study (annex 2), calves of approximately 6 weeks of age will be purchased from a veal producer. The first batch of calves (n=8) will adapt to the diet for 5 weeks, subsequently followed by 7 days of measurements in the respiration chambers, and subsequently followed by the second passage rate kinetics study (annex 3) and the P requirement study (annex 4). For batch 2 to 6, the same procedure will be used, with a delay of about 1 week for each batch. Hence, the results will be obtained over an age-range of about 6 weeks. The common interest in these three studies is the combination of the nutritional treatments, of which it takes time for calves to adapt (rumen development). With discomfort for the calves estimated as mild for the studies in annex 2 and 3, we consider it the best option. to re-use calves from the study in annex 2 for annex 3 and 4. As argued in annex 2 and 4, the number of calves required is approximately the same. For the studies in annex 2 and 3, comparison of observations on the same animals is important.

Literature

Erickson GE, Klopfenstein TJ, Milton CT, Brink D, Orth MW and Whitted KM. 2002. Phosphorus requirements of finishing feedlot calves.. J. Anim., Sci. 80(6) 1690-1695.

Kampman-van de Hoek, E, Gerrits, WJJ, van der Peet-Schwering, CMC Jansman, AJM and van den Borne, JJGC 2013. A simple amino acid dose-response technique to quantify amino acid requirements of individual meal-fed pigs Journal of Animal Science. 91, 10, p. 4788-4796

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.

As described above, the project will consist of 4 studies:

1. P requirements in veal calves - a pilot study. The objective of this study is to test whether a within-animal approach can be used to study P requirements. The outcome will determine the design of study 4. This study will be conducted with calves, individually housed on balance cages and provided with faecal collection bags to allow separate, quantitative collection of urine and faeces. The study duration will be 4 days (adaptation) and 6 days (experiment)
2. Passage rate kinetics in veal calves - ^{13}C tracer technique: Minimally invasive technique with stable isotope methods. This technique is based on a breath-test approach described by Van den Borne et al. (2015), and techniques widely used in humans and animals (MCue and Welch, 2016). Briefly, following a pulse dose of a ^{13}C tracer, ^{13}C labelled CO_2 is collected in exhaled air. If the tracer is well chosen, the exhalation pattern of the tracer will reflect the pattern of nutrient absorption and metabolism of the tracee. As the primary interest is in the timing of nutrient absorption, metabolism patterns as well as delays in exhalation caused by dilution in body pools need to be corrected for. For this study, calves will be purchased at an age of 6 weeks and adapted to the nutritional treatments for a period of 5 weeks in group-housing. The measurements will be conducted in pair-housed calves in climatized respiration chambers, frequently fed a SF mix (i.e., 6 times a day to create a steady state), and fed a MR twice daily. Different isotope tracers will be administered through the diet, spread over the 7d experimental period.
3. Passage rate kinetics in veal calves - faecal excretion curves. Faecal excretion patterns of indigestible markers in faeces following a pulse dose of markers representative for MR, concentrates and roughages. Following the approach described by Dhanoa et al., (1985). Briefly, this approach is based on the assumption that excretion kinetics of an indigestible marker will reflect retention time of digesta in the slowest compartment. This study will be conducted in a setting similar to study 1, with frequent faecal collections following the pulse-dosed markers. The length of the adaptation and experimental periods will be 4 and 5 days, respectively.
4. P requirements in veal calves fed different rations. The approach taken will depend on the outcome of the pilot. In the case the conventional approach will be used, the number of dietary regimes to be tested will be reduced from 4 to 2. This study will be conducted in a setting similar to study 1 and will last 21 days. In the case of a conventional approach, calves will be subjected to low P diets for 4 days, after which P excretion will be performed for a period of 7 d.

Literature

Dhanoa NS Siddons, RC, France J and Gale DL. 1985. A multicompartment model to describe marker excretion patterns in ruminant faeces. *Br J Nutr* 53: 663-671.

McCue, MD and Welch KC jr. 2016. 13C breath testing in animals: theory, applications and future directions. J. Comp. Physiol. B (2016) 186: 265-285.

Van den Borne JJGC, Heetkamp MJW, Buyse J, Niewold TA 2015 Fat coating of Ca butyrate results in extended butyrate release in the gastrointestinal tract of broilers . Livestock Science 2015 (175): 96-100.

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

For a description of the studies to be conducted as part of this project, please see the project outline above. Three milestones will be identified within this project, and a 4th one after completion of the animal experiments conducted within this project:

- 1) After study 1 (pilot), a decision will be made on how the fourth study will be conducted, i.e. a within-calf dose response approach or a between calf dose response approach.
- 2) An estimation of passage rate kinetics of MR and concentrates using the isotope method (study 2) and on MR, concentrates and roughages in the faecal collection method (study 3), both focusing on the first compartment of the GI tract (i.e. the rumen for the concentrates and roughages, the abomasum for the MR).
- 3) A validated approach of digesta passage kinetics using a combination of 13CO2 breath test approaches.
- 3) An estimate of P requirements as affected by the nutritional regimes applied in this project.
- 4) Upon completion of the 4 studies, the passage rate data will be used for improvement of the model simulating calf growth from nutritional inputs. P digestion and metabolism will be incorporated into this model, allowing the prediction of total P and N flows from ingestion to growth or excretion via urine or faeces.

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	P requirements in veal calves - a pilot study
2	Passage rate kinetics in veal calves - 13C tracer technique
3	Passage rate kinetics in veal calves - faecal excretion curves
4	P requirements in veal calves fed different rations

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'.	10400	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University	
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 P requirements in veal calves - a pilot study

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 direct goal of this pilot study is to determine whether we can measure the P requirements of individual veal calves using a within-calf dose response approach. When successful, it provides a more refined technique to determine P requirements under varying nutritional regimes in the future.

As described in section 3.4.1 of the project proposal, the principle of this approach is that after providing an excess of P via MR, P intake will be reduced by 20% via MR (in 1 step), leading to a reduction of P excreted via urine. The inflection point of the P-excretion curve against P intake will be assessed via nonlinear regression and assumed to represent the requirement of the individual calves. The plateau value, obtained at the lowest P intake, will represent the maximum efficiency of P utilization, likely influenced by SF intake.

During this pilot study, we will only monitor the rate of adaptation of urinary P excretion following a substantial reduction in P intake via the MR in a limited number of calves (n=6). If the rate of urinary P excretion stabilizes within 72h after the reduction in dietary P supply, the technique can be considered applicable for individual calves.

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

Six calves of approximately 8 weeks of age will be individually housed in metabolic cages, and fitted with harnesses to which plastic bags are attached for the quantitative collection of faeces. Clean urine can be collected in buckets underneath a funnel, mounted underneath the cage. Calves will be fed a normal ration with a high P milk replacer for the 4-d adaptation period and for the first 3 days of the experimental period, after which they will be switched to a MR lowering the P content of the MR by 20%, which will be fed the remaining 4 days. Typically, if urinary P excretion sensitively responds to a reduction of P intake via MR by 20%, it can be assumed that calves will respond to the within-calf dose response study (i.e. the contrast chosen should not be much larger than the intended change in P intake).

During the entire experimental period, quantitative, 12h urinary collections, and 24h faecal collections will be performed. This is done to determine the rate of adaptation of urinary P excretion after a reduction in P intake via the MR. In addition, salivary P concentrations will be determined 4 times daily during the experimental period.

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

The number of calves used in this experiment is based on the average P excretion in urine and faeces in several experiments with calves housed under similar conditions. It is based on the analysis of P flows in a study published by Berends et al., (2015), of which the data on P flows are

reported in an internal report by Plomp et al (2015). That study involved 8 calves and used a between-calf dose response approach. A reduction in P input via MR by 15% resulted in a tendency for a reduced P output via urine.

In the present study however, we will use a reduction in P intake of 20% (as described in section 2A - animal procedures). Moreover, we will use a within-calf dose response approach, which will reduce variation. Performing a power analysis (one sided), revealed that at least 6 calves are needed to demonstrate a significant reduction of P excretion via urine when reducing P input by 20%.

We do want to emphasize that with this pilot study we want to determine whether this within-calf dose response approach is applicable to determine the P requirements of individual calves. This will be mainly based on the assessment of the P-excretion curves against P intake via nonlinear regression rather than strict statistical analysis. If we simply cannot find a stabilized urinary P excretion within 72h after the reduction in dietary P supply, we conclude that this within-calf dose response approach does not work.

Literature

Berends, H., van den Borne, J. J. G. C., Røjen, B. A., Hendriks, W. H. & Gerrits, W. J. J. 2015. Effect of protein provision via milk replacer or solid feed on protein metabolism in veal calves. *Journal of Dairy Science*. 98, 2, p. 1119-1126

Plomp M, Gerrits WJJ, Schop TA, Heeres-vd Tol, JJ 2015. Fosforstromen in vleeskalveren. P en Ca balans in kalveren gevoerd met melkvervanger en ruw- en krachtvoer. Rapport Wageningen Livestock Research, 46pp [in Dutch], available on request

B. The animals

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

In this pilot experiment, 6 male Holstein Friesian calves will be used. The age of these calves will be approximately 6 weeks, and we will purchase them from a veal producer or use the calves available at the experimental facilities. Male calves will be used to ease separate collection of faeces and urine. Calves will be about 80 kg of BW at the onset of the trial, and close to 90 kg BW when the trial is finished.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
calves	moderate	6	

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 male Holstein Friesian calf is the target animal of this project. The rate of adaptation of urinary P excretion to changes in an excess or shortage of phosphorus cannot be estimated in another species. Additionally, passage rate kinetics are typically integrated into mathematical models predicting nutrient absorption following the provision of various dietary regimes. Such models are already available for pigs, dairy cows, and for calves fed exclusively on milk replacers. However, no such model is available yet for calves fed a combination of milk replacer and solid feeds. Therefore, the rate of adaptation of urinary P excretion to changes in an excess or shortage of phosphorus cannot be estimated by the use of a mathematical model. Reduction: this pilot study will be performed to investigate the possibility to study P requirements in individual calves rather than the conventional approach in which different levels of P are imposed on different calves, hence necessitating multiple groups of calves, estimating the average requirement of the calf population by regression based on observations obtained from different calves. When possible, less experimental animals are needed to obtain estimates of P requirements under various nutritional regimes. Refinement: As individual housing on metabolism cages causes discomfort, we'll take precautions to minimize the impact. We place pairs of metabolic cages close to each other to facilitate physical contact between two calves. Additionally, we enrich the metabolic cages with brushes, a dry teat for suckling needs, and provide a ball inside the cage. Additionally, the use of chains is minimized (to avoid unnecessary noise). Furthermore, experienced animal care takers will monitor the calves to be sure a potential case of illness or reduced welfare will be diagnosed in an early stage. Handling of the calves will be performed by experienced personnel carefully and quietly, preferably in rest to prevent unnecessary distress. Analgesia and medication are applied where needed. If (in rare cases) analgesia or medication may influence trial results, calves are treated and excluded from the trial. This study also

contributes to the refinement of future research determining passage rate kinetics of animals. For example, the duration of the study 'P requirement in veal calves fed different rations' (annex 4) depends on the rate of adaptation of urinary P excretion to changes in P intake via MR. It is important for this study to provide an accurate estimate of this rate of adaptation in order to minimize the duration of the study 'P requirement in veal calves fed different rations' (annex 4), and thus the duration of the individual housing of these calves.

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

The following measures will be taken to reduce the impact of housing in metabolism cages on welfare of the calves: - use of chains will be minimized as the noise can disturb the calves - availability of brushes, mounted on the cage and a dry teat to satisfy sucking needs - a ball inside the cage - cages will be organized in pairs close to each other to facilitate some physical contact between calves

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.

Based on a literature search within the Pubmed and Scopus database using 'calf, phosphorus requirement, milk replacer, roughage, and concentrate' as searching criteria, we conclude that no study has been published before regarding the P requirements in calves fed a ration based on MR, concentrates and roughages. P requirement studies in beef calves are available, but these calves are fed a ration based on concentrates and roughages without MR, and therefore do not take the potential to recycle P from the MR into account.

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.

Calves will be housed individually in metabolism cages. Fecal collection bags will be harnessed to the calves, to facilitate the quantitative collection of faeces and thereby the quantitative collection of clean urine in buckets underneath funnels, mounted underneath the cage. The dimensions of the cage will be 0.8 x 2m, and calves will be fixed to the front of the cage, allowing them to stand or lie freely. Housing on bedding material is not possible as clean urine needs to be collected from underneath the cages. As individual housing on metabolism cages causes discomfort, we'll take precautions to minimize the impact (i.e., minimized use of chains, cage enrichment including brushes, dry teat, and ball, and cages will be close to each other to facilitate physical contact between calves).

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?

Individual housing for 7 days, restricted movements, no bedding material on the floor (because clean urine needs to be collected from underneath the cages), harnesses to fix faecal collection bags. This could result in increased occurrence of abnormal oral behaviours (e.g., repetitive self-licking, flank or object sucking, tongue rolling).

Explain why these effects may emerge.

The calves are deprived from exploring their environment and some discomfort from wearing harnesses cannot be prevented.

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

The following measures will be taken to reduce the impact of housing in metabolism cages on welfare of the calves: - use of chains will be minimized as the noise can disturb the calves - availability of brushes, mounted on the cage and a dry teat to satisfy sucking needs - a ball inside the cage - cages will be organized in pairs close to each other to facilitate some physical contact between calves

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.

• a calf has feed refusals exceeding 20% of the amount of MR offered for a period exceeding 3 days. • a calf has a fever for 3 successive days, not responding to medical treatments proposed by a veterinarian, and signs of infection and inflammation. • a calf suffers from problems related to the harness, showing wounds at places the harness is connected. • in the expert judgement of the veterinarian, future observations on a calf will not provide reliable results. • in the expert judgement of the veterinarian, continuation of the experiment with a calf will cause discomfort higher than foreseen for this trial.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of calves to be removed from the experiment is estimated to be less than 10% during the duration of the trial, based on previous experience in trials of similar duration. The major portion of this 10% is expected to origin from feed refusals due to health problems unrelated to

experimental procedures. In addition, problems arising from the harnesses will have a very short duration, as calves will then be removed from the trial.

K. Classification of severity of procedures

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

The level of discomfort is expected to be as listed below: • Individual housing on balance cages, in absence of bedding material during 10 days: moderate • Wearing of harnesses for the collection of faecal collection bags: mild Hence the cumulative discomfort in this trial is estimated at moderate. Based on previous experience, collecting saliva samples are considered to cause no discomfort. We will insert two cotton swabs (150 x 4 mm) into the mouth of a calf, who will chew on them voluntarily, subsequently we will place these into a salivette.

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.

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'.	10400	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University	
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 Passage rate kinetics in veal calves - 13C tracer technique

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

For this study, 48 male, Holstein-Friesian calves will be purchased at about 6 weeks of age. They will be housed in groups and assigned to one of 4 dietary treatments, varying in the intake of solid feed (SF) and milk replacer (MR) (factor 1) and the concentrate:roughage ratio within the SF (factor 2) in 2x2 factorial arrangement. The calves will be adapted to their diets for a period of 5 weeks to allow rumen development and rumination behaviour to completely adjust to the levels and composition of SF intake. After that, calves will be housed for 7 days in pairs in one of 4 respiration chambers, and frequently fed (i.e. 6x daily) their SF portion while receiving their MR supply twice daily.

This setup (pair or calves in one of 4 respiration chambers), results in a staggered planning with 6 batches of 8 calves (4 pairs) undergoing the same experimental procedure, each batch starting one week after the previous one. In this way, creating a range in age (as also described in section 3.4.1 - research strategy of the project proposal). The first batch of 8 calves will adapt to their diet for 5 weeks, subsequently followed by 7 days of measurements in the respiration chambers. The second batch of calves (also n=8) will adapt to the diet for 6 weeks (i.e., basis of 5 weeks + the 7 days that the first group of calves in housed in respiration chambers), subsequently followed by 7 days of measurements in the respiration chambers. This pattern continues for all 6 batches. In this manner, observations are achieved over an age range of 6 weeks.

When the calves are housed in the respiration chambers, every two days, one of the MR or SF meals will be spiked with a ^{13}C stable isotope tracer, measuring the kinetics of recovery in $^{13}\text{CO}_2$ in exhaled air as a measure of the rate of ruminal fermentation and/or digesta passage kinetics. ^{13}C tracers will be selected after a thorough search of literature, but likely include naturally labelled yeast proteins (to be included in the concentrate), ^{13}C -glycine (to be included in the MR), ^{13}C octanoate and ^{13}C - NaHCO_3 , to be injected intravenously. The latter is intended to correct for a delay between nutrient oxidation and ^{13}C exhaled in breath.

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

During the 5-week adaptation period, calves will be housed in groups (divided over several departments within the experimental facilities) and fed diets according to the experimental schedule. MR will be provided twice daily and SF will be provided in two portions upon completion of MR intake. During the 7d experimental period, calves will be housed in pairs inside a climatized respiration chamber. During this week, continuous measurement of CO_2 , $^{13}\text{CO}_2$ and CH_4 production and the consumption of O_2 will be performed. During this period, SF will be provided in 6 equal portions spread over the 24h period to ensure a steady state. Following oral administration of ^{13}C tracers, patterns of $^{13}\text{CO}_2$ excretion will be measured. To account for a delay in $^{13}\text{CO}_2$ exhalation following arrival in the bicarbonate pool, $^{13}\text{CO}_2$ excretion patterns will be analyzed following intravenous injection of a bolus ^{13}C - NaHCO_3 .

After the calves have been in the climate respiration chambers for 7 days, the calves subsequently enter the study described in Annex 3.

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

This experiment is designed to quantify differences between the dietary treatments on digesta passage rate kinetics. As calves are housed in pairs and the gaseous exchanged is measured in a respiration chamber, a pair is considered as the experimental unit for this study. Treatment differences on dependent variables (mostly time of peak recovery of $^{13}\text{CO}_2$ after a bolus of ^{13}C tracer) will be analyzed by ANOVA using the dietary contrasts as fixed effects. In a previous study (Berends et al., 2015) it was demonstrated that provisional estimates of ruminal fractional passage rates could be evaluated using 8 calves per treatment, applying an approach using indigestible markers. A significant difference could be detected for a difference in feeding level of SF, similar to the one intended for this study. Considering a reduction in variation with two calves per experimental unit, we consider 6 experimental units for each treatment combination to be sufficient to estimate the effect of our dietary treatments on passage rate kinetics. For the methodology applied in this study, estimates of variation between experimental units are not available, although the $^{13}\text{CO}_2$ breath test has been applied previously in calves in our facilities (see e.g. Gilbert et al., 2016), also with 2 calves in a respiration chamber. A 3-h difference in the time of peak metabolism of fructose and glucose could be quantified using 5 pairs of calves per treatment ($P < 0.01$). Six pairs of calves per treatment combination would enable us to significantly detect a 2h difference in the time of peak of $^{13}\text{CO}_2$ recovery.

Literature

Berends, H., van den Borne, J. J. G. C., Røjen, B. A., Hendriks, W. H. & Gerrits, W. J. J. 2015b. Effect of protein provision via milk replacer or solid feed on protein metabolism in veal calves. *Journal of Dairy Science*. 98, 2, p. 1119-1126.

Gilbert, M. S., Pantophlet, A. J., van den Borne, J. J. G. C., Hendriks, W. H., Schols, H. A. & Gerrits, W. J. J. 2016. Effects of replacing lactose from milk replacer by glucose, fructose, or glycerol on energy partitioning in veal calves. *Journal of Dairy Science*. 99, 2, p. 1121-1132

B. The animals

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

For this study, 48 male Holstein Friesian calves will be used. The age of these calves will be approximately 6 weeks, and we will purchased them from a veal producer. Male calves will be used to ease separate collection of faeces and urine. The latter is not specifically needed for the study described in this Annex, but essential for the studies described in Annex 3 and Annex 4. Because we will use the same calves for all studies, we also

need male calves for this study. At the beginning of this experiment, all calves will be 6 weeks of age. At the end of the experiment, the age of the calves will range from 12 weeks to 19 weeks.

Species calves	Origin minor	Maximum number of animals 48	Life stage
-------------------	-----------------	---------------------------------	------------

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 male Holstein Friesian calf is the target animal of this project. Passage rate kinetics measured in other ruminants animals are not applicable for calves, because based on the results obtained by Berends et al. (2015) it can be concluded that the passage rate of digesta in calves is likely substantially lower compared with other ruminants. Additionally, passage rate kinetics are typically integrated into mathematical models predicting nutriënt absorption following the provision of various dietary regimes. Such models are already available for pigs, dairy cows, and for calves fed exclusively on milk replacers. However, no such model is available yet for calves fed a combination of milk replacer and solid feeds. Therefore, the rate of adaptation of urinary P excretion to changes in an excess or shortage of phosphorus cannot be estimated by the use of a mathematical model. Reduction: the objective of this study is to evaluate the possibility to use minimally invasive ¹³C breath test approach for the measurement of passage rate kinetics in calves. Outcomes will be validated with more conventional measures of passage rate kinetics (annex 3 of this project). When succesful, this approach can be used for repeated measurement of digesta passage rate in calves, or potentially also in other ruminant species. Refinement: Calves will be socially housed during the adaptation period and will be housed in pairs in the respiration chambers to avoid social isolation. We intend to use free housing, but if needed we restrain the calves during feeding. Measurements will be non-invasive, with

the only exception of an intravenous injection of ^{13}C labelled NaHCO_3 . Furthermore, experienced animal care takers will monitor the calves to be sure a potential case of illness or reduced welfare will be diagnosed in an early stage. Handling of the calves will be performed by experienced personnel carefully and quietly, preferably in rest to prevent unnecessary distress. Analgesia and medication are applied where needed. If (in rare cases) analgesia or medication may influence trial results, calves are treated and excluded from the trial.

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

No adverse effects are foreseen

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.

Based on a literature search within the Pubmed and Scopus database using 'calf, passage rate kinetics, milk replacer, roughage, and concentrate' as searching criteria, we conclude that no study has been published that uses the ^{13}C tracer technique to measure digesta passage rate kinetics in calves fed combination of MR and solid feed are available. Hence this is not a repeat of research of others.

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.

Calves will be socially housed during the adaptation period and will be housed in pairs in the respiration chambers to avoid social isolation. We intend to use free housing, but if needed we will restrain the calves during feeding. In the respiration chambers, two calves will be housed in a pen of about

1.80x 3.5m. This is related to the maximum inner measures of the respiration chambers and needed for accurate measurement of short-term changes in 13CO2 exhalation.

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.

No pain relieving methods will be used, as the intravenous injection will only cause momentary pain.

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?

Absence of bedding material during 7 days, restraintment during feeding if needed, iv injection of a pulse dose of NaHCO₃, and weighing of the calves. We do not expect other adverse effects, including the different dietary treatments. The four dietary treatments, varying in the intake of SF and MR (factor 1) and the concentrate:roughage ratio within the SF (factor 2), will be within the range which is fed in practice.

Explain why these effects may emerge.

There will be some discomfort from the absence of bedding material. Moreover, the possible restraintment during feeding (when eating from eachothers food) will cause some discomfort. The iv injection will cause some discomfort, but only represents momentary pain.

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

We will house the calves in pairs to ensure social interaction.

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.

Not as a result of the animal procedures, but health problems may arise necessitating animals to be removed from the trial. Humane endpoints are:
- feed refusals exceeding 20% of the daily allowance for a period exceeding 3 days - a calf has a fever for 3 successive days, not responding to medical treatments proposed by a veterinarian. - in the expert judgement of the veterinarian, future observations on a calf will not provide reliable results. - in the expert judgement of the veterinarian, continuation of the experiment with a calf will cause discomfort higher than foreseen for this trial.

Indicate the likely incidence.

Likely 5% or less, because the calves are housed socially during the adaptation period and in pairs in the respiration chambers. Moreover, we intend to house the calves freely (not restrained, with the possible exception during feeding).

K. Classification of severity of procedures

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

The level of discomfort is expected to be as listed below: • Group housing in adaptation phase and in respiration chambers, in absence of bedding material during 7 days: mild • if needed calves will be restrained during feeding: mild • iv injection of a pulse dose of NaHCO₃: mild • weighing of the calves (weekly): mild Hence the cumulative discomfort in this trial is estimated at mild.

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.

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'.	10400	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University	
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 Passage rate kinetics in veal calves - faecal excretion curves

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

For this study, 48 male, Holstein-Friesian calves will be re-used from the study described in annex 2. The experimental procedures are staggered, with measurements on every batch of 8 calves starting a week after the previous one. The results from this study will thus be obtained over an age range of 6 weeks.

Upon completion of the study described in annex 2, the calves remain housed in pairs. They will be fed the same experimental dietary treatments, varying in the intake of solid feed (SF) and milk replacer (MR) (factor 1) and the concentrate:roughage ratio within the SF (factor 2) in 2x2 factorial arrangement. The calves then have already been adapted to these diets for at least 6 weeks. Calves will be fitted with harnesses to which plastic bags are attached for the quantitative collection of faeces. Three indigestible markers will be used to trace the concentrates (likely TiO₂ or alkanes), roughage (likely cr-mordant long straw) and the MR (likely Co-EDTA). The markers will be administered in a pulse dose 48h (roughage), 24h (concentrate) or 4h (MR) prior to the start of the faecal collection period. Faecal bags will be checked bi-hourly for a period of 4 days, and marker excretion will be quantified in time. Following methods published by Dhanoa et al. (1985), faecal excretion curves of markers will be analyzed to estimate the overall mean retention time of digesta and the passage rate of the slowest compartment (rumen for the markers of the concentrate and roughage; abomasum for the markers of the MR).

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

Calves will be housed in pairs, and fitted with a harness to which faecal collection bags will be attached. If the combination of housing in pairs and the harnesses is not successful, we will place a fence in between the calves. We will restrain calves during replacement of the faecal collection bags and, if needed, also during feeding.

Calves will be fed according to normal procedures and faeces will be collected 2-hourly during 4 days after the start of the trial.

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

The calves from this experiment, will be re-used from the study described in Annex 2 and will subsequently be re-used for the study described in

Annex 4. Therefore, the number of calves used in this study depends largely on the minimum number of calves needed for those two studies. To summarise:

The study described in Annex 2 needs 48 calves to achieve the objective of that trial. As calves are housed in pairs and the gaseous exchanged is measured in a respiration chamber, a pair is considered as the experimental unit for the study in Annex 2. In a previous study (Berends et al., 2015) it was demonstrated that provisional estimates of ruminal fractional passage rates could be evaluated using 8 calves per treatment, applying an approach using indigestible markers. A significant difference could be detected for a difference in feeding level of SF, similar to the one intended for the study in Annex 2. Considering a reduction in variation with two calves per experimental unit, we consider 6 experimental units for each treatment combination to be sufficient to estimate the effect of our dietary treatments on passage rate kinetics.

Additionally, results from this study will be compared with the results from the study described in annex 2 (passage rate kinetics - ¹³C tracer technique) and therefore needs to be conducted with the same calves continued on the same treatments.

Furthermore, the study described in Annex 3 needs 48 calves as well to achieve the objective of that trial. Depending on the option chosen, there will be one estimate of P requirements per calf, or one per SF treatment. Between-calf variation of such estimates are unknown, but previous experience using a similar dose response approach for amino acid requirements in pigs (e.g. Bruininx et al., 2015) and for responses to graded levels of starch or starch products in calves (Gilbert et al., 2015) demonstrate sensitive responses to step-wise changes in the driving variable using 10 animals/treatment. For estimating P requirements using a between-calf approach, 24 calves per treatment assigned to graded levels of P intake is an approach previously shown to provide accurate P requirements, and can be expected to be adequate to develop reliable requirement estimates for our two nutritional conditions.

Literature

Berends, H., van den Borne, J. J. G. C., Røjen, B. A., Hendriks, W. H. & Gerrits, W. J. J. 2015b. Effect of protein provision via milk replacer or solid feed on protein metabolism in veal calves. *Journal of Dairy Science*. 98, 2, p. 1119-1126.

Bruininx, E. M. A. M., van den Borne, J. J. G. C., Eising, I., Vervenne, P., Sakkas, P. & Gerrits, W. J. J. 2015. Optimal lysine:DE ratio in growing pigs is independent of starch or fat as main energy source at two energy intake levels *Journal of Animal Science*. 93, 10, p. 4774-4780

Gilbert, M. S., van den Borne, J. J. G. C., Berends, H., Pantophlet, A. J., Schols, H. A. & Gerrits, W. J. J. 2015. A titration approach to identify the capacity for starch digeston in milk-fed calves. *Animal*. 9, 2, p. 249-257

B. The animals

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

In this experiment, 48 male Holstein Friesian calves will be re-used from the study described in annex 2 of this project. These calves will be the same calves as decribed in Annex 2. Male calves will be used to ease separate collection of faeces and urine. At the beginning of this experiment, the age of the calves will range from 12 weeks to 19 weeks. At the end of the experiment, the age of the calves will range from 13 weeks to 20 weeks.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
Calves	mild	48	

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

C. Re-use

Yes > Explain why re-use is considered acceptable for this animal procedure.

Discomfort during previous experiment (described in annex 2 of this project) is classified as mild. The comparison of the results of annex 2 with the results of this study is important, having similar conditions and working with the same calves is preferred. Additionally, if we would be working with a new batch of calves, we have to adapt these calves to the diets for several weeks. This is not necessary if we re-use the calves from Annex 2.

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 male Holstein Friesian calf is the target animal of this project. Passage rate kinetics measured in other species are not applicable for calves, because based on the results obtained by Berends et al. (2015) it can be concluded that the passage rate of digesta in calves is lower compared with other species. Additionally, passage rate kinetics are typically integrated into mathematical models predicting nutriënt absorption following the provision of various dietary regimes. Such models are already available for pigs, dairy cows, and for calves fed exclusively on milk replacers. However, no such model is available yet for calves fed a combination of milk replacer and solid feeds. Therefore, the rate of adaptation of urinary P excretion to changes in an excess or shortage of phosphorus cannot be estimated by the use of a mathematical model. Reduction: the objective of this study is to estimate mean retention time of digesta and passage rate in the rumen, and secondly to provide a reference for the minimally invasive 13C breath test approach for the measurement of passage rate kinetics in calves, described in the study of annex 2. Using the same calves of the study described in annex 2, we reduce the total number of calves needed. Refinement: After careful consideration, it is decided to avoid the use of metabolism cages in this study. Therefore, the calves will be housed in pairs. We intend to house the calves in pairs while they are fitted with harnesses. It is questionable whether this is possible, because it might be that the calves will start interacting with the harness of the other calf. If all goes well, we continue housing them in pairs. If the housing in pairs in combination with the harnesses does not work, we will place a fence within their pen. Calves will be harnessed but will only be fixed when the faecal collection bags need to be replaced. We intend to use free housing, but if needed we restrain the calves during feeding. Furthermore, experienced animal care takers will monitor the calves to be sure a potential case of illness or reduced welfare will be diagnosed in an early stage. Handling of the calves will be performed by experienced personnel carefully and quietly, preferably in rest to prevent unnecessary distress. Analgesia and medication are applied where needed. If (in rare cases) analgesia or medication may influence trial results, calves are treated and excluded from the trial.

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

No adverse effects are foreseen.

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.

Based on a literature search within the Pubmed and Scopus database using 'calf, passage rate kinetics, milk replacer, roughage, and concentrate' as searching criteria, we conclude that no study has been published in which digesta passage rate kinetics has been measured in calves fed combination of MR and solid feed are available. Hence this is not a repeat of research of others.

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.

Calves will be housed in pairs in a pen size meeting the EU directive. Calves will be harnessed, but will only be fixed when the faecal collection bags need to be replaced. If housing in pairs with calves that are harnessed is not possible, a fence will be placed in between the calves. We intend to use free housing, but if needed we restrain the calves during feeding. Bedding material cannot be used as the possible consumption can alter digesta passage rates.

G. Location where the animals procedures are performed

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?

Harnesses to fix faecal collection bags, fixing the calves when switching the faecal collection bags, the possible restraint during feeding, and the possible individual housing if calves interfere with each others harness.

Explain why these effects may emerge.

Some discomfort from wearing harnesses cannot be prevented. In addition, fixing the calves at times of changing the faecal collection bags as well as restraining the calves during feeding will cause some discomfort. Moreover, the possible restraint during feeding (when eating from eachothers food) and the possible individual housing (when interfering with eachothers harness), will cause some discomfort.

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

Harnesses will be checked daily and adjusted if needed. Fixing calves at the time of changing faecal collection bags is needed, but as opposed to housing on metabolism cages, it allows calves to move around freely when not fixed.

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.

- a calf has feed refusals exceeding 20% of the amount of MR offered for a period exceeding 3 days.
 - a calf has a fever for 3 successive days, not responding to medical treatments proposed by a veterinarian.
 - a calf suffers from problems related to the harness, showing wounds at places the harness is connected.
 - in the expert judgement of the veterinarian, future observations on a calf will not provide reliable results.
 - in the expert judgement of the veterinarian, a calf is not fit/happy/healthy (reduced welfare) without affecting experimental results.
-

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of calves to be removed from the experiment is estimated at less than 10% during the duration of the trial. The major portion of this 10% is expected to origin from feed refusals due to health problems unrelated to experimental procedures. In addition, problems arising from the harnesses will have a very short duration, as calves will then be removed from the trial

K. Classification of severity of procedures

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

The level of discomfort is expected to be as listed below: • Housing in pairs, or individually, fixing at the time of changing faecal collection bags during 7 days: mild • Wearing of harnesses for the collection of faecal collection bags: mild Hence the cumulative discomfort in this trial is estimated as mild.

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.

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'.	10400	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Wageningen University	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 4	Type of animal procedure P requirements in veal calves fed different rations

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The objective of this trial is to estimate minimal P requirements for growth of calves fed different mixtures of solid feed and milk replacer. There are two options for this trial, depending on the outcome of the pilot (annex 1). When the rate of adaptation of urinary P excretion following a substantial reduction in P intake via the MR stabilizes within 72 h after the reduction in dietary P supply, the technique can be considered applicable for individual calves. If this is the case, a within-calf response dose technique can be used to estimate P requirement for individual calves, in analogy to the dose response approach to estimate amino acid requirements, described by Kampman-van de Hoek (2013). If the results of the pilot demonstrate that more time is needed for urinary P excretion to stabilize, a more traditional, between animal, dose-response approach will be used (see e.g. Erickson et al., 2002), comparing P excretion at different levels of intake between animals.

The age of the calves at the start of the measurements in this experiment will range from 13 weeks of age to 18 weeks of age, depending on the batch of calves. This is needed because of the simultaneous availability of 4 climate-respiration chambers for the study described in annex 2 (calves are re-used). In each batch, 8 calves will be used. During the 6 batches, measurements on 48 calves are obtained. Hence differences between batches represent a composite effect of time, age and batch of calves.

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

Option 1: within-calf dose response approach

Upon completion of the study described in annex 3 of this project, calves will remain on their 4 nutritional treatments, but transferred to a MR with a high P level. All calves will be housed individually on metabolism cages. Calves will be fitted with harnesses to allow quantitative collection of faeces and collection of clean urine from funnels mounted underneath the cage. P intake via the MR will be reduced in a step-wise manner in 7 steps of 3d each (21d in total). Faecal P excretion will be measured daily, and urinary excretion in 12h periods. The response of total and urinary P excretion to a reduction in P intake will be analyzed using nonlinear regression techniques to estimate the inflection point (see Kampman-van de Hoek et al., 2013), which can be considered the minimum P requirement for each calf. Effects of the nutritional treatments on the estimated P requirements will be analyzed.

With this option, the calves will be followed for 21d in total. It could be that the minimum P requirement of a calf is reached before that (e.g., step 5 at 15 days or with step 6 at 18 days). However, the faecal and urine samples will be analyzed in the laboratory after the experiment. Therefore, we are unable to determine the minimum P requirement while the experiment is running, thus each calve has to be followed for 21d.

Option 2: between calf dose response approach

Upon completion of the study described in annex 3 of this project, calves will remain housed in pairs for two weeks and transferred to two dietary treatments: i.e. two levels of SF intake at a fixed roughage: concentrate ratio. Hence there will be 24 calves on each SF treatment. Within each SF treatment, calves will be assigned to a MR with one of 6 P concentrations, varying from low (at 50% of the estimated requirements) to high (at 150% of the estimated requirements). Thus, there will be 4 calves assigned to each P level within the SF treatment. Calves will then be housed individually on metabolism cages. Calves will be fitted with harnesses to allow quantitative collection of faeces and collection of clean urine from funnels mounted underneath the cage. Faecal and urinary P excretion will be quantified of the complete 7d collection period. The response of total and urinary P excretion to a increasing P intake will be analyzed using nonlinear regression techniques to estimate the inflection point. In this way, one estimate will be obtained for each SF treatment,

Literature

Erickson GE, Klopfenstein TJ, Milton CT, Brink D, Orth MW and Whitted KM. 2002. Phosphorus requirements of finishing feedlot calves. *J. Anim., Sci.* 80(6) 1690-1695.

Kampman-van de Hoek, E, Gerrits, WJJ, van der Peet-Schwering, CMC Jansman, AJM and van den Borne, JJGC 2013. A simple amino acid dose-response technique to quantify amino acid requirements of individual meal-fed pigs *Journal of Animal Science*. 91, 10, p. 4788-4796

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

Depending on the option chosen, there will be one estimate of P requirements per calf, or one per SF treatment. Between-calf variation of such estimates are unknown, but previous experience using a similar dose response approach for amino acid requirements in pigs (Kampman van de Hoek et al, 2013; Bruininx et al., 2015) and for responses to graded levels of starch or starch products in calves (Gilbert et al., 2015) demonstrate sensitive responses to step-wise changes in the driving variable using 10 animals/treatment.

For estimating P requirements using a between-calf approach, 24 calves per treatment assigned to graded levels of P intake is an approach

previously shown to provide accurate P requirements, and can be expected to be adequate to develop reliable requirement estimates for our two nutritional conditions.

Literature

Bruininx, E. M. A. M., van den Borne, J. J. G. C., Eising, I., Vervenne, P., Sakkas, P. & Gerrits, W. J. J. 2015. Optimal lysine:DE ratio in growing pigs is independent of starch or fat as main energy source at two energy intake levels *Journal of Animal Science*. 93, 10, p. 4774-4780

Gilbert, M. S., van den Borne, J. J. G. C., Berends, H., Pantophlet, A. J., Schols, H. A. & Gerrits, W. J. J. 2015. A titration approach to identify the capacity for starch digestion in milk-fed calves. *Animal*. 9, 2, p. 249-257

B. The animals

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

In this experiment, 48 male Holstein Friesian calves will be re-used from the study described in annex 2 and 3 of this project. Male calves will be used to ease separate collection of faeces and urine. At the beginning of this experiment, the age of the calves will range from 13 weeks to 20 weeks. At the end of the experiment, the age of the calves will range from 16 weeks to 23 weeks.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
---------	--------	---------------------------	------------

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.

Discomfort during the previous experiment was considered mild. The interest in this project is in the same treatments imposed on calves of annex 2, 3, and 4, facilitating repeated measurements.

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 male Holstein Friesian calf is the target animal of this project. Effects of SF intake and composition on P requirements of calves cannot be estimated in vitro or by the use of mathematical models. Reduction: Depending on the results of the pilot study (i.e. when a within-calf titration approach appears feasible), this study contributes to a reduction in the number of calves needed to obtain estimates of P requirements under various nutritional conditions. Refinement: The duration of the dose response study depends on the rate of adaptation of urinary P excretion to changes in P intake via MR. If changes in urinary P excretion following a reduction in P intake via the MR adapt within 48 hours, the duration of the dose response study can be reduced from 21 to 14 d, and thus reducing the duration of the individual housing of these calves. As individual housing on metabolism cages causes discomfort, we'll take precautions to minimize the impact. We place pairs of metabolic cages close to each other to facilitate physical contact between two calves. Additionally, we enrich the metabolic cages with brushes, a dry teat for suckling needs, and provide a ball inside the cage. Additionally, the use of chains is minimized (to avoid unnecessary noise). Furthermore, experienced animal care takers will monitor the calves to be sure a potential case of illness or reduced welfare will be diagnosed in an early stage. Handling of the calves will be performed by experienced personnel carefully and quietly, preferably in rest to prevent unnecessary distress. Analgesia and medication are applied where needed. If (in rare cases) analgesia or medication may influence trial results, calves are treated and excluded from the trial.

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

The following measures will be taken to reduce the impact of housing in metabolism cages on welfare of the calves: - use of chains will be minimized as the noise can disturb the calves - availability of brushes, mounted on the cage and a dry teat to satisfy sucking needs - a ball inside the cage. - cages will be organized in pairs close to each other to facilitate some physical contact between calves

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.

Based on a literature search within the Pubmed and Scopus database using 'calf, phosphorous requirement, milk replacer, roughage, and concentrate' as searching criteria, we conclude that no study has been published that measured P requirements in calves fed combination of MR and solid feed are available. Hence this is not a repeat of research of others. P requirement studies in beef calves are available, but these calves are fed a ration based on concentrates and roughages without MR, and therefore do not take the potential to recycle P from the MR into account.

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.

Calves will be housed individually in metabolism cages. Fecal collection bags will be harnessed to the calves, to facilitate the quantitative collection of faeces and thereby the quantitative collection of clean urine in buckets underneath funnels, mounted underneath the cage. The dimensions of the cage will be 0.8 x 2m, and calves will be fixed to the front of the cage, allowing them to stand or lie freely.

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?

Prolonged individual housing, restricted movements, no bedding material on the floor, harnesses to fix faecal collection bags. This might result in increased occurrence of abnormal oral behaviours (e.g., repetitive self-licking, flank or object sucking, tongue rolling). Please note: we are aware that

in some occasions the calves receive a diet well below the P requirement. In comparison with studies performed with pigs, as well as the duration of the experiment, we do not consider this as a cause of discomfort. We do however acknowledge the risk, and will assess the calves daily to see the development of P deficiency symptoms in an early stage. After this experiment had ended, all calves will be fed the high P MR.

Explain why these effects may emerge.

The calves are deprived from exploring their environment due to a relative long period of individual housing in metabolic cages. Some discomfort from wearing harnesses cannot be prevented.

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

Housing on bedding material is not possible as clean urine needs to be collected from underneath the cages. The following measures will be taken to reduce the impact of housing in metabolism cages on welfare of the calves: - use of chains will be minimized as the noise can disturb the calves - availability of brushes, mounted on the cage and a dry teat to satisfy sucking needs - a ball inside the cage. - cages will be organized in pairs close to each other to facilitate some physical contact between calves After this experiment had ended, all calves will be fed a diet which had a P content equal or above P requirements.

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.

- a calf has feed refusals exceeding 20% of the amount of MR offered for a period exceeding 3 days.
 - a calf has a fever for 3 successive days, not responding to medical treatments proposed by a veterinarian, and signs of infection and inflammation.
 - a calf suffers from problems related to the harness, showing wounds at places the harness is connected.
 - a calf which clearly suffers from P deficiency (occurrence of symptoms like bone fractures).
 - in the expert judgement of the veterinarian, future observations on a calf will not provide reliable results.
 - in the expert judgement of the veterinarian, continuation the experiment for a calf will cause more discomfort than foreseen.
-

Indicate the likely incidence.

The likely incidence of calves to be removed from the experiment is estimated at about 15% during the duration of the trial. The major portion of this 15% is expected to origin from feed refusals due to health problems unrelated to experimental procedures. In addition, problems arising from the harnesses will have a very short duration, as calves will then be removed from the trial. The higher incidence compared with the study described in annex 1 is related to the longer duration of this trial.

K. Classification of severity of procedures

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

The level of discomfort is expected to be as listed below: • Individual housing on balance cages, in absence of bedding material during 21 days: moderate • Wearing of harnesses for the collection of faecal collection bags: mild • Exposure to a P deficient diet for a period of about 10 days: moderate Hence the cumulative discomfort in this trial is estimated at moderate.

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.

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: **AVD104002017874**
2. Titel van het project: Influence of solid feed intake on digesta passage rate and phosphorus requirements of veal calves
3. Titel van de NTS: Invloed van ruw- en krachtvoer op fosforbehoefte vleeskalveren
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
[REDACTED]
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 20-02-2017
Aanvraag compleet:
In vergadering besproken: 20-02-2017
Anderszins behandeld: n.v.t.
Termijnonderbreking(en) van 24-02-2017 tot 01-03-2017
Besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen: n.v.t.
Aanpassing aanvraag: 01-03-2017
Advies aan CCD: 21-03-2017
7. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager:
Datum vragen: 24-02-2017
Datum antwoord: 01-03-2017
Gestelde vragen *en antwoorden*:
M.b.t. het projectvoorstel:
De DEC verzoekt u de aangekruiste doelcategorieën te wijzigen, aangezien zij van mening is, dat 'Basic Research' hier niet aan de orde is. Het gaat in de ogen van de DEC om het ontwikkelen van een methode en het vaststellen van variabelen. *Dit is aangepast. De doelcategorie 'Basic Research' is niet meer aangekruist. Dit onderzoek heeft nu alleen 'Translational and applied research' als doelcategorie.*
M.b.t. alle appendices:
De DEC verzoekt u bij D. (vervanging) ook in te gaan op de mogelijkheden voor het gebruik van modellen.
We hebben in alle appendices bij sectie D de mogelijkheid voor het gebruik van modellen beschreven. Specifieker, modellen zijn wel beschikbaar voor varkens, melkvee en vleeskalveren die alleen kalvermelk ontvangen, maar nog niet voor vleeskalveren die zowel kalvermelk als ruwvoer en krachtvoer ontvangen. Daardoor bieden mathematische modellen geen mogelijkheid tot vervanging.
Daarnaast verzoekt zij u alle appendices toe te spitsen op en te beperken tot de proefbehandelingen en de context, waar de betreffende appendix betrekking op heeft. Zij heeft de indruk dat er nu soms teksten staan, die niet aan de orde zijn (bijv. in Appendix 1 onder D.: "ruminatie is essential" is hier niet relevant). *Alle appendices zijn nagelezen en de nodige tekst is verwijderd. Bijvoorbeeld de*

tekst die jullie aangeven en '13CO2 excretion...of Wageningen University', de laatste zin van Appendix 2 sectie A.

Bovendien verzoekt ze u bij B: (Specify the species, origin, estimated numbers, and life stages) op alle gevraagde aspecten in te gaan en ook in appendices 2 en 3 de keuze voor mannelijke dieren te onderbouwen.

Bij alle Appendices hebben we nu onderbouwing gegeven voor alle aspecten.

Tevens verzoekt ze u bij I. (Describe which other adverse effects on the animals welfare may be expected?) consequent alle bronnen van ongerief (die niet onder H. worden genoemd) te vermelden (bijv. als gevolg van individuele huisvesting, ontbreken van bedding etc.).

Bij alle Appendices staat nu beschreven waaruit het ongerief bestaan (bijvoorbeeld individueel huisvesten, ontbreken bedding, mogelijk vastbinden tijdens voermomenten, IV injectie, etc.).

M.b.t. appendix 1:

De DEC verzoekt u bij 2.A., de verschillende stappen duidelijker te beschrijven, aangezien in haar ogen het aantal dagen in de eerste alinea ("P intake will be step-wise reduced via MR (in 7 steps with every step lasting 72h)") niet overeenkomt met de tweede alinea ("Calves will be fed a normal ration with a high P milk replacer for the 4-d adaptation period and for the first 3 days of the experimental period, after which they will be switched to a MR lowering the P content of the MR by 20%, which will be fed the remaining 4 days").

Het aantal dagen dat beschreven was in de eerste alinea (i.e., 7 steps of 72 hours) was incorrect. Het betreft geen 7 stappen van 72 uur. Het betreft slechts 1 stap: na 3 dagen wordt de P concentratie in de kalvermelk met 20% verlaagd en wordt dit nog gedurende 4 dagen gevoerd. Met andere woorden, het tijdsbestek is 7 dagen in totaal. De tekst in de eerste alinea is aangepast.

M.b.t. appendix 3:

De DEC verzoekt u bij 2.A de "statistical methods" uitgebreider te beschrijven en niet alleen te verwijzen naar de andere appendices, aangezien elke appendix op zichzelf moet staan.

De statische onderbouwing van Appendices 2 en 4 zijn nu uitgebreider beschreven in Appendix 3 in plaats van er alleen naar te verwijzen.

M.b.t. de NTS:

De DEC verzoekt u de NTS zo aan te passen conform aanpassingen in de overige documenten.

Gedaan. Zo zijn bijvoorbeeld de wiskundige modellen opgenomen bij 'vervanging' en worden verschillende vormen van ongerief uitgebreider beschreven.

De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag is een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om over de aanvraag te adviseren vanuit het oogpunt van onafhankelijkheid, onpartijdigheid en beschikbare expertises.
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een DEC-lid, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Deze betrokkenheid bestaat in het uitvoeren van praktische handelingen en ondersteuning in de organisatie tijdens dit experiment.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. De DEC vindt het een goed georganiseerd en slim opgezet, goed doordacht project, waar met betrekkelijk weinig dieren veel informatie kan worden verkregen. Het kan op termijn bijdragen aan vermindering van proefdiergebruik. Hoewel drie typen dierproef betrekking hebben op fosfor en een type dierproef (app. 2) daar los van staat, ziet de DEC wel de samenhang, aangezien appendix 2 wel ook betrekking heeft op de 'passage rate', wat de kern is van de fosforbenutting.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort, gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling. Het gaat om fundamenteel onderzoek: het ontwikkelen van een methode en het vaststellen van variabelen.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van de aanvraag is: het ontwikkelen van technieken om de voedselpassagesnelheid non-invasief te meten, het bepalen van de invloed van solid food daarop en het bepalen van de P-benutting.
Het uiteindelijke doel van de aanvraag is: het realiseren van een optimale benutting van P door aanpassing van het dieet en van verminderde uitstoot naar het milieu. De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belanghebbenden en hun morele waarden in het project zijn: kalveren (proefdieren): ze ervaren ongerief als gevolg van de proefbehandelingen en hun gezondheid kan in het geding zijn als ze te weinig P krijgen; kalveren (doeldieren): gezondheidswinst door betere afstemming van P op de behoefte; de boeren: economisch voordeel; het milieu: vermindering van de P-uitstoot naar het milieu; kalvervoerfabrianten: economisch voordeel.
6. Voor zover de DEC dat kan inschatten is er geen aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De DEC heeft vastgesteld dat de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven, afgaande op het geschreven voorstel en het oordeel van de IvD, voldoende gewaarborgd zijn. De leden die bij het project zijn betrokken beschikken over inhoudelijke expertise en kennis over zowel dit onderwerp als over de praktische uitvoerbaarheid van de experimenten.
8. De DEC heeft vastgesteld dat het project goed is opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters logisch en helder aansluiten bij de aangegeven doelstelling. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen in de ogen van de DEC leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Er wordt in eerste instantie een pilot uitgevoerd, waardoor dierproeftype 4 beter ingeschat kan worden. De andere twee experimenten zijn ter ondersteuning van wat het beste in experiment 4 getest kan worden, dat is logisch en navolgbaar. Het project is goed georganiseerd, met een logische opbouw in de tijd. Alle 4 de typen dierproef leiden volgens de DEC tot het uiteindelijk behalen van de doelstelling.

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheid op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: in diverse typen dierproef worden dieren hergebruikt uit vorige proeven. De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Er is in die gevallen altijd sprake van gering ongerief in de voorgaande proef.
10. De dieren worden niet gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. De dieren worden (af-

hankelijk van het type dierproef) tijdelijk individueel gehuisvest, zonder bedding. Daarnaast worden de dieren tijdens de metingen in de klimaatrespiratiecellen in paren gehuisvest zonder bedding.

11. De DEC stelt vast dat het cumulatieve ongerief als mild of matig (afhankelijk van het type dierproef) voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit: een enkele injectie of bloedafname, gedurende geen enkele periode zijn de dieren alleen. In een deel van de proeven worden de kalveren aangeboden en worden ze individueel gehuisvest, waarbij een deel een voer met een erg laag P-gehalte aangeboden krijgt.
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier, anders dan voortvloeiend uit de proefbehandelingen.
13. De DEC heeft vastgesteld dat de criteria voor humane eindpunten (HEPs) goed zijn gedefinieerd en dat goed is ingeschat welk percentage van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken. Er wordt niet verwacht dat als gevolg van de proefbehandelingen HEPs worden bereikt. Bij lage P-waarden wordt er expliciet naar gedrag gekeken en er vindt behandeling plaats bij interferente ziektes (zie ook 18.).

3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. De behoefte aan fosfor voor kalveren die een combinatie van kalvermelk, ruwvoer en krachtvoer krijgen verstrekt kan niet bij andere dieren worden vastgesteld omdat de uitscheiding van fosfor bij kalveren anders werkt dan bij andere diersoorten. Er zijn geen proefdiervrije methoden beschikbaar, zoals wiskundige modellen.
15. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. De onderzoekers geven blijk van hun kennis over regressieanalyses en geven aan dat de opzet deels gebaseerd is op eerder uitgevoerde experimenten. Daarnaast vindt er hergebruik plaats, waardoor men met minimale aantallen kan volstaan.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. Er worden niet-invasieve methoden gebruikt. Tijdens de studies worden de kalveren, indien mogelijk sociaal gehuisvest (in groepen of in paartjes). Individuele huisvesting wordt zo kort mogelijk gehouden. Hierbij wordt gebruik gemaakt van afleidingsmateriaal/ kooiverrijking en wordt fysiek contact mogelijk gemaakt. De DEC ziet geen extra mogelijkheden voor verfijning, anders dan die de onderzoeker nu toepast.

Naast bovengenoemde punten merkt de DEC op, dat de te ontwikkelen techniek mogelijk kan bijdragen aan verminderd proefdiergebruik in de toekomst. Dit heeft zowel betrekking op verfijning, vervanging, als op vermindering.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

17. De dieren worden niet van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd waarom dit noodzakelijk is. Er worden alleen mannelijke dieren gebruikt. Enerzijds is het nodig mest en urine op te vangen, wat makkelijker is bij mannelijke kalveren. Daarnaast zijn de mannetjeskalveren in principe onbruikbaar voor de melkveehouderij en ze worden derhalve opgefokt voor hun vlees. Dit onderzoek laten uitvoeren met vrouwelijke dieren heeft geen enkele toegevoegde waarde voor het doel, noch zorgt het voor enige reductie in het totale aantal dieren, eerder een vermeerdering.
18. De dieren worden niet gedood in het kader van het project. De DEC acht het wenselijk de dieren, die voer met een laag P-gehalte krijgen na afloop van het project te monitoren, om te voorkomen, dat ze te snel worden hergebruikt.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag van het project is: Weegt het vergaren van kennis omtrent voedings- en verteringsfysiologie van het voer, een efficiënter gebruik van fosfor en het verlagen van de milieubelasting op tegen het maximaal matige ongerief voor 48 kalveren?
2. In de afweging heeft de DEC geconstateerd dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. In haar afweging heeft de DEC meegewogen dat als het project zijn uiteindelijke doel haalt, dat er m.b.t. het milieu sprake is van een substantieel belang door een vermindering van de P-uitstoot naar het milieu. Ook voor de kalveren (doeldieren) is er in dat geval sprake van een reële gezondheidswinst door betere afstemming van P op de dierbehoefte. Voor zowel de boeren als de veevoedersector speelt daarbij ook een economische waarde. Die heeft de DEC als een beperkt belang ingeschat. Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in het geding. Zij ervaren maximaal matig ongerief als gevolg van de handelingen binnen dit project. De DEC heeft in de beoordeling van het doel meegewogen dat uitgebalanceerde voeding van belang is voor alle vormen van rundveehouderij en dat dit project zich niet enkel richt op de intensieve veehouderij, maar ook relevantie heeft daarbuiten (opfok van melkvee, de biologische houderij). Aanvullend is de bevordering van kennis van voedings- en verteringsfysiologie en het verbruik van fosfor in vleeskalveren interessant als onderzoeksdoelstelling omdat er vanuit de (Europese) politiek druk is om de fosforuitstoot te verminderen. Door het gehele proces rondom de opfok te optimaliseren, kan dit mogelijk bereikt worden. De DEC heeft de aanvraag beoordeeld binnen de context dat de vleesindustrie maatschappelijk is geaccepteerd en zij vindt het ethisch verantwoord hier onderzoek naar te doen met 48 dieren die gedurende 21 dagen maximaal matig ongerief ondergaan. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag en is van mening dat dit onderzoek zelf een bijdrage kan leveren aan de 3V's bij toekomstig onderzoek.
3. De centrale morele vraag kan met "ja" beantwoord worden.

E. Advies

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University
[Redacted]
Postbus 59
6700 AB WAGENINGEN
[Barcode]

**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
AVD104002017874
Bijlagen
1

Datum 11 april 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 "Influence of solid feed intake on digesta passage rate and phosphorus requirements of veal calves" met aanvraagnummer AVD104002017874. 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 "Influence of solid feed intake on digesta passage rate and phosphorus requirements of veal calves" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 mei 2017 tot en met 30 november 2017.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC WUR. Dit advies is opgesteld op 21 maart 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 27 maart 2017 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. De DEC is gevraagd een toelichting te geven op de afwijkende huisvesting.

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:
11 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD104002017874

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:


plv. 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: Wageningen University
Adres: Postbus 59
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN
Deelnemersnummer: 10400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 mei 2017 tot en met 30 november 2017, voor het project "Influence of solid feed intake on digesta passage rate and phosphorus requirements of veal calves" met aanvraagnummer AVD104002017874, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC WUR. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 17 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 maart 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 21 maart 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 21 maart 2017, ontvangen op 21 maart 2017, aanvullend advies, zoals ontvangen op 27 maart 2017.

Aanvraagnummer:
AVD104002017874

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 P requirements in veal calves - a pilot study				
	Runderen (Bos taurus) / Kalveren	6	Matig	
3.4.4.2 Passage rate kinetics in veal calves - 13C tracer technique				
	Runderen (Bos taurus) / Kalveren	48	Licht	
3.4.4.3 Passage rate kinetics in veal calves - faecal excretion curves				Dit zijn dezelfde dieren als 3.4.4.2
	Runderen (Bos taurus) / Kalveren	48	Licht	
3.4.4.4 P requirements in veal calves fed different rations				Dit zijn dezelfde dieren als 3.4.4.2
	Runderen (Bos taurus) / Kalveren	48	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 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:

AVD104002017874

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:

AVD104002017874

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 W17-09									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	NTS2017883								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
10	Reactie aanvulling aanvraag			x					
11	Niet-technische samenvatting nieuw	x							
12	Advies CCD		x						x
13	Beschikking en vergunning				x		x	x	



Centrale Commissie Dierproeven

01 MAART 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 Gegevensaanvrager

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 uwdeelnemernummer 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 border="1"> <tr> <td>Naam instelling of organisatie</td> <td>Rijksuniversiteit Groningen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td>[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>1179037</td> </tr> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>A. Deusinglaan 1, [REDACTED]</td> </tr> <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>	Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen	Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]	KvK-nummer	1179037	Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1, [REDACTED]	Postbus		Postcode en plaats	9713 AV Groningen	IBAN	NL45ABNA0474567206	Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen
Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen																	
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																	
KvK-nummer	1179037																	
Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1, [REDACTED]																	
Postbus																		
Postcode en plaats	9713 AV Groningen																	
IBAN	NL45ABNA0474567206																	
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen																	
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 border="1"> <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 border="1"> <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 border="1"> <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>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.	Functie	[REDACTED]		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]		
(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 hieronder een toelichting en ga verder met vraag 6
-

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 2 - 2017 |
| Einddatum | 1 - 2 - 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Generation, characterization and validation of immune-humanized Patient Derived Xenograft models for anti-cancer treatment.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het ontwikkelen van muismodellen voor onderzoek naar patiënt-specifieke immunologische behandelmethoden tegen kanker.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|--|
| Naam DEC | |
| Postadres | |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1541 Lege

Wijziging € Lege

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

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

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

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

27 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.

Immunotherapy has recently proven highly effective in clinical trials, yet only in a subset of patients. Developing novel preclinical models to assess therapeutic efficacy against a heterogeneous population of tumors and derive response biomarkers is therefore essential to translate this success to a broader (or

preselected) patient population. The heterogeneity and close reflection of the patient situation afforded by patient-derived xenograft (PDX) models is ideally suited for this purpose. Indeed, response rates of implanted tumor grafts against various conventional agents as well as investigational drugs have been reported to correlate with responses of patients (ref 1). However, a key component absent from current PDX models is the presence of an immune system, most notably T cells. In this proposal, we will therefore evaluate a novel approach to reconstitute T cells in PDX-bearing animals.

[REDACTED]

[REDACTED]

In this proposal the focus will be on establishing proof-of-principle for this approach using PDX of ovarian cancer, a model with which we have extensive experience (ref 1).

References:

1. Alkema, N. G., Tomar, T., Duiker, E. W., Meersma, G. J., Klip, H., van der Zee, A. G. J., de Jong, S. (2015). Biobanking of patient and patient-derived xenograft ovarian tumour tissue: efficient preservation with low and high fetal calf serum based methods. *Scientific Reports*, 5, [14495].

[REDACTED]

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 aim of this proposal is to establish proof-of-principle for a novel immune-competent patient derived xenograft (PDX) model of cancer. If successful, we will apply for follow-up projects to test novel immunotherapeutic strategies in this model. The main research question is: does our immune-competent PDX model [REDACTED] reflect the immune situation observed in patients? This question will be

addressed in three subprojects, with go/no-go moments after subproject 1 and 2:

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Perspectives

After successful completion of this project, we will validate this novel immune-humanized PDX model as a platform for identifying new therapeutic targets and novel treatment strategies for the treatment of ovarian cancers based on immune modulation. Here fore, additional CCD approval will be sought at a later time when more data on success rates, humanization percentage, etc. are available from the initial above described 3 appendices.

References:

6. Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinská E, Byrne AT, Caldas C, Clarke RB, de Jong S, Jonkers J, Mælandsmo GM, Roman-Roman S, Seoane J, Trusolino L, Villanueva A. Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov.* 2014;4: 998-1013.

3.3 Relevance

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

Cancer is still one of the leading causes of death. Many cancer patients do not respond to current treatments. Our research group, therefore, is interested in developing new treatment strategies to circumvent treatment resistance in these patients. It is of extreme importance to generate clinically more relevant models, such as the PDX models, to test these novel treatment strategies. This is essential, since pre-clinical models based on established cell line xenografts do not have a good predictive value for clinical treatment response in cancer patients. It has been described that PDX models preserve tumor heterogeneity and show more of the histology and genetic features of the human cancer specimen they are derived from. Hence, PDX models are more reliable models to test novel treatment strategies that have been tested extensively in vitro. We are aware that establishing PDX models implies a lot of work

and a large number of animals is needed. Therefore, we are part of the EuroPDX Consortium, which aims at collaborating between different research institutes in sharing not only knowledge but also tumor tissue needed for additional PDX models that are established by the different institutes.

3.4 Research strategy

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

We aim to establish proof-of-principle for a novel immune-competent PDX model and use these models in the future to test novel treatment strategies.

[Redacted text block]

[Redacted text block]

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 three subprojects.

[Redacted text block]

[Redacted text block]

[Redacted]

In all three subprojects the animals can undergo the following procedures: anaesthesia by inhalation, implantation of [Redacted] cells and/or tumors under anaesthesia, blood sampling (tail vein) and tumor measurements. At the end of the experiment, the animals will be sacrificed under anaesthesia. Tumor tissue and organs are collected for *ex vivo* analysis.

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.

[Redacted]

Together, these experiments will provide proof-of-principle for our strategy as a novel preclinical model for cancer research.

Milestone 1: [Redacted] Milestone 1 will be achieved when we can demonstrate functionality *in vivo* by T cell reconstitution. A no-go decision for subproject 2/3 will be made if no humanization is observed.

Milestone 2: [Redacted]

Milestone 3: For use in translational research, immune-humanized mice bearing an autologous PDX tumor need to be established. Milestone 3 will therefore be reached when we observe immune responses of humanized mice towards the tumor graft similar to that which is observed in the patient. Milestone 3 will not be pursued if milestone 1 cannot be achieved. The exact humanization used for this milestone will be dependent on the outcome of milestones 1 and 2.

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	Humanizing immune-deficient mice [Redacted]
2	Optimizing humanization [Redacted]
3	Establishing immune-humanized PDX models of ovarian cancer
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



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 | Het ontwikkelen van muismodellen voor onderzoek naar patiënt-specifieke immunologische behandelmethode(n) tegen kanker.
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Kanker, oncologie, muismodel

2 Categorie van het project

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

3 Projectbeschrijving

- 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | Het doel van dit project is om *immunologisch humanemuismodellen* te ontwikkelen voor kankeronderzoek. Voor het opzetten van deze muismodellen wordt immuunweefsel afkomstig van patiënten in muizen geïmplant. In de vakliteratuur wordt dit *humanisering* van muizen genoemd.
- | Daarnaast zullen in deze muizen stukjes tumor van dezelfde patiënt geïmplant worden, het zogeheten *Patient Derived Xenograft (PDX)*. Eerder is aangetoond dat de tumoren in deze PDX-modellen zich vergelijkbaar gedragen als de tumoren in de desbetreffende patiënten. Ook vertonen deze PDX-modellen een vergelijkbare respons op verschillende anti-kankertherapieën.
- | Door toevoeging van een humaan immuunsysteem ontstaan *humane PDX-modellen*, die in de toekomst gebruikt kunnen worden om nieuwe immunologische behandelstrategieën tegen kanker te onderzoeken. Het einddoel is om de juiste behandeling aan de juiste patiënt te kunnen geven.

3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?	<p>De hoge sterfte aan kanker vraagt dringend om het ontwikkelen van nieuwe behandelingen om de overlevingskans van patiënten te verbeteren.</p> <p>Met de in dit project ontwikkelde humane PDX-modellen krijgen we de beschikking over diermodellen met een tumor die een grote gelijkenis vertoont met de tumor in de patiënt zelf. Door de muizen gelijktijdig te humaniseren, kunnen we de interactie tussen het afweersysteem en het biologische gedrag van deze tumoren observeren onder omstandigheden die in de mens niet mogelijk zijn.</p> <p>Tumoren van één patiënt kunnen bijvoorbeeld in verschillende humane muizen behandeld worden met verschillende immunologische geneesmiddelen. Hiermee zou bepaald kunnen worden welke behandeling het meest geschikt is voor deze patiënt. Uiteindelijk kan dit vertaald worden naar een verbetering van de diagnose en behandeling van patiënten in de kliniek.</p>
3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?	Muizen, het geschatte aantal is 610
3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?	Afhankelijk van het experiment kunnen dieren in meer of mindere mate negatieve gevolgen ondervinden. Hierbij kan gedacht worden aan stress, ongemak en mogelijk verandering van lichaamsgewicht en aantasting van de conditie door implantatie van immuunweefsel, tumorgroei of onverwachte bijwerkingen van handelingen.
3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?	matig
3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?	De dieren worden geëuthanaseerd in het kader van de proef

4 Drie V's

4.1 Vervanging Geef aan waarom het gebruik van dieren nodig is voor de beschreven doelstelling en waarom proefdiervrije alternatieven niet gebruikt kunnen worden.	<p>Bij het ontwikkelen van nieuwe geneesmiddelen voor kankerpatiënten zijn dierproeven nog steeds belangrijk. Op het moment worden hier vaak kankercellijnen voor gebruikt. Het wordt echter steeds duidelijker dat kankercellijnen geen goede weergave zijn van de enorme verschillen tussen verschillende vormen van kanker en ook niet van de verschillen tussen verschillende patiënten met dezelfde soort kanker. Het is daarom onwaarschijnlijk dat kankercellijnen gebruikt kunnen worden om de juiste behandeling voor te schrijven aan de juiste patiënt.</p> <p>Door het gebruiken van tumorweefsel afkomstig van individuele patiënten in een dier wordt wel een betrouwbaar, sterk op de tumor van de patiënt lijkend model verkregen. Dit model kan gebruikt worden om nieuwe behandelingen te testen en de resultaten naar de kliniek te vertalen. Een belangrijk obstakel bij het gebruik van dergelijke modellen op dit moment is echter de afwezigheid van een humaan afweerstelsel.</p> <p>Gezien de recente doorbraken op het gebied van immuuntherapie is het essentieel om betere diermodellen te ontwikkelen waarbij tumor en afweerstelsel van de patiënt tezamen geanalyseerd kunnen worden.</p>
4.2 Vermindering	Er wordt gebruik gemaakt van uitgebreid literatuuronderzoek, gegevens uit

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

weefselkweken, ervaring binnen de onderzoeksgroep met het ontwikkelen van het PDX-model en een Europees samenwerkingsverband voor PDX-modellen. Dit heeft onder meer als doel onnodige herhaling van experimenten tussen onderzoeksgroepen te voorkomen.

Door middel van statistische analyses wordt het minimaal noodzakelijke aantal dieren bepaald.

Zogeheten go/no-go momenten worden gebruikt om alleen strikt nodige experimenten uit te voeren.

4.3 **Verfijning**

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

De keuze van muizen is op basis van reeds beschikbare wetenschappelijke informatie en de ervaring van de onderzoeksgroep en een Europees samenwerkingsverband voor PDX-modellen.

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

Voor alle experimenten zal de "Code of practice dierproeven in het kankeronderzoek" worden aangehouden. De dieren worden nauwlettend gevolgd. Indien nodig wordt pijnstilling toegepast

5In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen



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 | Humanizing immune-deficient mice <input type="text" value=""/> |
- 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.

Aim: This animal procedure aims to humanise mice

Background: Immunotherapy has recently proven highly effective in clinical trials, yet only in a subset of patients. Developing novel models to preclinically assess therapeutic efficacy against a heterogeneous population of tumors and derive response biomarkers is therefore essential to translate this success to a broader (or preselected) patient population. The heterogeneity and close reflection of the patient situation afforded by PDX models is ideally suited for this purpose. However, a key component absent from current PDX models is the presence of an immune system, most notably T cells. Humanization of PDX mice has the potential to side-step this obstacle by introducing a patient-specific immune system in mice bearing an autologous tumor graft.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

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

Under anesthesia, [REDACTED] cells will be implanted under the kidney capsule of [REDACTED]. Implantation under the kidney capsule was chosen as it has been used [REDACTED] in literature due to the highly vascularized nature of this region. T cell reconstitution (and phenotype) in these mice will be monitored in the blood by retro-orbital sampling of 100uL before and at 6 week intervals after implantation. Mice will be sacrificed when blood T cell levels start to decrease, after a maximum of 30 weeks after implantation (latest time point used in literature), or if signs of graft-vs-host disease are observed. After termination, organs will be harvested and analysed for T cell infiltration by parallel immunohistochemistry and flow cytometry, and in functional assays to determine self-tolerance.

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

Differences between blood and organ reconstitution will be assessed by a paired Student's t-test ($p < 0.05$) comparing to sham-operated mice. The lack of T cells in athymic mice has been extensively documented with minimal variation observed after years of use of this model. We are therefore confident no untreated animals are needed as a control here.

B. The animals

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

Genetically altered animals from an established animal breeding company inside or outside the EU, maximum 120 mice, young adults.

From literature, immune deficient mice of ~4-8 weeks are preferable because of optimal grafting of [REDACTED] cells. For this study, female mice will be used. Female mice are preferable since our tissue is derived from human females and differences in (both human and animal) male and female immune systems have frequently been described (see e.g. Furman et al. PNAS 2013).

To establish the robustness of our approach, we will use [REDACTED] cells from 4 different [REDACTED] lines: 2 from ovarian cancer patients with wildtype BRCA, 1 from a patient with germline BRCA1 mutation and 1 from a patient with germline BRCA2 mutation (the most common germline mutations in this disease). Since it is possible that despite proper differentiation *in vitro*, our [REDACTED] lines will not be able to generate functional thymic epithelium *in vivo*, we will also use 1 [REDACTED] cell line that was previously used in literature for

From literature, the maximum group size required in similar experiments to obtain significant differences was 10 mice per condition. We will repeat each experiment twice to establish the reproducibility of our experiments. Therefore, with (4 lines, a line, and a sham control group)x2, this means a maximum: 6x10x2=120 mice total. However, we will pursue several strategies to minimize this number (see below).

Maximum number of animals needed: 120

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:

We have already optimized *in vitro*. However, true functionality cannot be determined *in vitro* and *in vivo* experiments are needed for proof of function.

Reduction:

T cell reconstitution after implantation of cells has been reported in a number of publications with significant differences between sham- and -implanted mice reported in each paper. However, group size and variation between animals differs between all papers (3-10 animals per group), potentially due to differences in the cells used.

Since we have insufficient information to assess the anticipated variation in our models, we have initially chosen a group size of 5 animals and have also chosen to start with only the two BRCA lines. We will then perform a proper power analysis based on the observed variation. For the untreated control group, however, we believe more than 3 animals would be unnecessary. The lack of T cells in the *BRCA* lines has been extensively documented with minimal variation observed after years of use of this model. The first experiment will therefore require only 5 sham + 5 + 5 + 5 = 20 animals, followed by an interim analysis and possible extension to another 5 sham + 5 + 5 + 5 = 20 animals. If the initial number of animals per group was sufficient, a 5 + 5 experiment for the 2 BRCA-mutant lines will be performed, if not: a 10 + 10 experiment will be performed for the BRCA-mutant lines.

Refinement:

We have extensive experience with the proposed animal procedures and optimal refinements of actions for this model are in place.

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

All procedures will be performed under general anaesthesia where required and adequate pain relief will be employed when necessary. Animals will be housed in groups with cage enrichment and food and drink will be administered ad libitum. Procedures will be limited to a minimum and when possible performed at the same time. Symptoms of pain, suffering and anxiety will be closely monitored by behavioral observations and by monitoring the weight of the animals and recorded in a welfare diary. If loss of

weight of more than 15% occurs, animals will be euthanized. Although it has not been reported in literature for [redacted] grafts, graft-versus-host disease (GvHD) might occur. Animals will be monitored especially closely for early signs of GvHD (skin lesions) and euthanized immediately upon early symptoms to spare further suffering. GMOs are handled under the applicable laws and safety standards for it.

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.

[redacted]

After completion of this (short) animal procedure, we will actively disseminate results to the scientific community to avoid unnecessary repetition of our experiments.

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.

Before surgery and [redacted] implantation, each animal will undergo full anesthesia. During surgery, each animal will receive pain medication (analgesia) intraoperatively to ensure reduction of pain after surgery and anesthesia recovery.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Graft-versus-host disease (GvHD) might occur that could result in discomfort. Animals will be monitored for GvHD by assessing the occurrence of skin lesions.

Explain why these effects may emerge.



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

The welfare is checked regularly and intensifies when necessary. GvHD is not expected to occur during the time-frames proposed here. Nevertheless, animals will be monitored especially closely for early signs of GvHD and euthanized immediately upon early symptoms to spare mice further suffering.

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.

Mice will be euthanized when an animal is no longer eating or drinking or weight loss of more than 15% is observed. Humane endpoints will also be applied when animals develop GvHD (skin lesions).

Indicate the likely incidence.

Weight loss of more than 15% of the body weight can occur after a surgical procedure, however this is rare. Based on literature, the occurrence of GvHD in the proposed time frame is unlikely to occur.

K. Classification of severity of procedures

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

The level of discomfort for the procedure described should be rated as moderate. Animals will experience mild discomfort due to handling, moderate discomfort due to implantation of [redacted] cells under renal capsule, and induction and recovery from anaesthesia. Therefore the cumulative expected levels of discomfort will be classified as moderate. The highest level of discomfort from a single action is moderate.

Under anaesthesia implantation of [redacted] cells under renal capsule – moderate
Handling of the animal for welfare evaluation – mild
Blood sampling – mild
Sacrificing under anaesthesia – non-recovery

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be terminated under general anaesthesia. This termination is essential for harvesting, organs for ex vivo analysis of T cell reconstitution.

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 | Optimizing humanization  |
- 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.









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

Under anesthesia, scaffolds seeded with [REDACTED] cells will be implanted subcutaneously in athymic mice. As a control, scaffolds seeded with only [REDACTED] will be used. A reference group where $\sim 4 \times 10^6$ [REDACTED] cells are implanted under the kidney capsule of athymic mice will also be used (see appendix 1). T cell reconstitution (and phenotype) in these mice will be monitored in the blood by retro-orbital sampling of 100uL before and at 6 week intervals after implantation. Mice will be sacrificed when blood T cell levels start to decrease, after a maximum of 30 weeks after implantation (latest time point used in literature), or if signs of graft-vs-host disease are observed. After termination, organs will be harvested and analysed for T cell infiltration by parallel immunohistochemistry and flow cytometry, and in functional assays to determine self-tolerance.

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

Differences between blood and organ reconstitution of T cells (absolute number and percentage of total) will be assessed by Kruskal-Wallis test using a Dunns post-test ($p < 0.05$) comparing all individual groups. Only superior immune-reconstitution (assessed by statistically significant increases) will be considered a success.

B. The animals

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

Genetically altered animals from an established animal breeding company inside or outside the EU, maximum 70 mice, young adults.

From literature, immune deficient mice of $\sim 4-8$ weeks are preferable because of optimal grafting of [REDACTED] cells. For this study, female mice will be used. Female mice are preferable since our tissue is derived from human females and differences in (both human and animal) male and female immune systems have frequently been described (see e.g. Furman et al. PNAS 2013).

To minimize the number of animals required, we will first use only one [REDACTED] line (BRCA wt). We will have several groups:

1. A control group for humanisation using [REDACTED] cells implanted under the kidney capsule as in appendix 1 (control).
2. A group implanted subcutaneously with [REDACTED] scaffolds [REDACTED]
3. A group implanted subcutaneously with [REDACTED] scaffolds [REDACTED]
4. A group implanted subcutaneously with [REDACTED] scaffolds [REDACTED]

We do not believe implantation of scaffolds alone could mediate immune reconstitution in these animals and therefore prefer not to unnecessarily use animals for such a control group. Similarly, we believe it would not be relevant within the setup of this experiment to once again include a sham-surgery or untreated group as we have done for appendix 1. It might however be biologically possible that [REDACTED] cells alone could mediate some form of immune reconstitution after e.g. de-differentiation and we therefore believe this control group is warranted.

From literature, the maximum group size required in similar experiments to obtain significant differences in T cell reconstitution was 10 mice per condition (see references included with the application). Therefore: 4 (groups of one [REDACTED] line) \times 10 (animals per group) = 40 animals are initially required.

However, we will pursue several strategies to minimize this number (see section D).

If the [redacted] scaffolds and/or [redacted] scaffolds approach proves equal/superior to the control implantation (as assessed by statistically significant increases in absolute number and percentage of T cells), we will expand only this group (if both, only the group with the highest level of reconstitution) to include the other 3 [redacted] lines described in appendix 1 to establish the robustness of this approach.

This would then result in an additional maximum number of: 3 [redacted] lines with 1 group) x 10 (animals per group) = 30 animals. However, we will pursue several strategies to minimize this number (see section D).

Maximum number of animals needed is therefore: 40+30=70 (see below for reduction measures)

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:

We have already optimized [redacted] *in vitro*. However, true functionality of thymic cells cannot be determined *in vitro* and *in vivo* experiments are needed for proof of function.

Reduction:

As discussed in appendix 1, T cell reconstitution after implantation of [redacted] cells has been reported in a number of publications with significant differences between sham- and [redacted]-implanted mice reported in each paper. However, group size and variation between animals differs between all papers (3-10 animals per group), potentially due to differences in the [redacted] cells used.

The final number of animals needed for each group (to a maximum of 10) within this appendix is therefore dependent on the optimal number of animals identified in appendix 1. The minimum required number will obviously be selected for this procedure.

In addition, we have chosen to initially only compare reconstitution for a single [redacted] line, thereby reducing the maximum number of animals required in total (from 4x4x10=160 to 70). We believe this does not comprise our experimental setup as we are here evaluating differences in host environment and not (as in appendix 1) differences in [redacted] characteristics.

Refinement:

We have extensive experience with the proposed animal procedures and optimal refinements of actions for this model are in place.

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

All procedures will be performed under general anaesthesia where required and adequate pain relief will be employed when necessary. Animals will be housed in groups with cage enrichment and food and drink will be administered ad libitum. Procedures will be limited to a minimum and when possible performed at the same time. Symptoms of pain, suffering and anxiety will be closely monitored by behavioral observations and by monitoring the weight of the animals and recorded in a welfare diary. If loss of

weight of more than 15% occurs, animals will be euthanized. Although it has not been reported in literature for ■■■ grafts, graft-versus-host disease (GvHD) might occur. Animals will be monitored especially closely for early signs of GvHD (skin lesions) and euthanized immediately upon early symptoms to spare further suffering. GMOs are handled under the applicable laws and safety standards for it.

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.

As described in appendix 1, to the best of our knowledge, no data is available on the function of ■■■ in vivo, a critical question for their use in humanization strategies. Furthermore, no publications described different implantation strategies for ■■■ cells, nor the use of ■■■ for improving development. After completion of this procedure, we will actively disseminate our results to the scientific community to avoid unnecessary repetition of our experiments.

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.

Before surgery and ■■■ implantation, each animal will undergo full anesthesia. During surgery, each animal will receive pain medication (analgesia) intraoperatively to ensure reduction of pain after surgery and anesthesia recovery.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Graft-versus-host disease (GvHD) might occur that could result in discomfort. Animals will be monitored for GvHD by assessing the occurrence of skin lesions.

Explain why these effects may emerge.



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

The welfare is checked regularly and intensifies when necessary. GvHD is not expected to occur during the time-frames proposed here. Nevertheless, animals will be monitored especially closely for early signs of GvHD and euthanized immediately upon early symptoms to spare mice further suffering.

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.

Mice will be euthanized when an animal is no longer eating or drinking or weight loss of more than 15% is observed. Humane endpoints will also be applied when animals develop GvHD (skin lesions).

Indicate the likely incidence.

Weight loss of more than 15% of the body weight can occur after a surgical procedure, however this is rare. Based on literature, the occurrence of GvHD in the proposed time frame is unlikely to occur.

K. Classification of severity of procedures

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

The level of discomfort for the procedure described should be rated as moderate. Animals will experience mild discomfort due to handling, moderate discomfort due to implantation of [redacted] cells under renal capsule, or subcutaneously in scaffolds, and induction and recovery from anaesthesia. Therefore the cumulative expected levels of discomfort will be classified as moderate. The highest level of discomfort from a single action is moderate.

Under anaesthesia implantation of [redacted] under renal capsule- moderate

Under anaesthesia implantation of [redacted] subcutaneously- moderate

Handling of the animal for welfare evaluation- mild

Blood sampling - mild

Sacrificing under anaesthesia - non-recovery

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be terminated under general anaesthesia. This termination is essential for harvesting, organs for ex vivo analysis of T cell reconstitution.

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'. 10500
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. University of Groningen
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 3 | Establishing immune-humanized PDX models of ovarian 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.

Aim: This animal procedure is a proof-of-principle experiment to humanize mice bearing Patient-Derived Tumor Xenografts (PDX) by implanting () cells derived from the same patient (see appendix 1 and 2).

Background: Within the animal procedures described in appendix 1 and 2 of this application, we expect to establish that athymic mice can be efficiently humanized (). Here, we will assess the immune response of these humanized mice against tumors (PDX) from the same patient.

Preliminary data: We have successfully established ovarian cancer PDX models with a high engraftment efficiency. Further, our research group is part of the European PDX (EurOPDX) consortium whose main goal is to establish a European multi-cancer PDX databank. Within the consortium we share knowledge and whenever possible tissue from established PDX models among each other to increase the number of PDXs per tumor subtypes. Ample experience with generating PDX models is therefore available. Optimal humanization of mice using () cells will be established in appendix 1 and 2 of the application (assessed by absolute T cell numbers and percentage of total circulating immune cells). We will use the humanization approach outlined in appendix 2, unless this approach proves inferior to the strategy used in appendix 1. Of note, at equal reconstitution, we will also opt for the humanization approach outlined in appendix 2 as we believe the subcutaneous implantation () to be practically superior to implantation of () cells under the renal capsule.

Plan of investigation: We will humanize mice according to the optimal procedure established in appendix

1 or 2 while also subcutaneously implanting a PDX tumor from the same patient. We will assess whether humanization prior to, or after implantation of tumor, is more successful in recapitulating the human tumor-immune micro-environment. Tumor, blood, bone marrow, spleen, [REDACTED] etc. will be analysed for immune reconstitution using a combination of flow cytometry and immunofluorescent analysis of tissue. We will determine "self" tolerance by implanting a tumor PDX from another (HLA-mismatched) patient. These outcome measures will determine immune competence and self-tolerance and evaluate our strategy as a suitable approach for humanisation of mice.

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

Under anesthesia, mice are implanted with [REDACTED] cells under the kidney capsule, or subcutaneously with scaffolds [REDACTED] (depending on the outcome of appendix 1 and 2). In addition, mice will be implanted in the flank (contralateral if scaffolds are used) with tumor tissue. Briefly, the skin of the neck of the animal will be shaved and disinfected. A 1 cm skin incision will be made to be able to form a subcutaneous pocket in the side of the lower back. One tumor piece is deposited in the pocket and the skin is closed with absorbable sutures. Animals receive pain medication intraoperatively. From our experience with PDX models of ovarian cancer, we expect tumors to start growing after 3-6 weeks. T cell reconstitution (and phenotype) in these mice will be monitored in the blood by retro-orbital sampling of 100 μ L before and at 6 week intervals after implantation. Mice will be sacrificed when blood T cell levels start to decrease, after a maximum of 30 weeks after implantation (latest time point used in literature), if signs of graft-vs-host disease are observed, or if tumor size reaches 1000-1500 mm^3 (tumor growth will be monitored by caliper measurements). After termination, tumor and organs will be harvested and analysed for T cell infiltration by parallel immunohistochemistry and flow cytometry, and in functional assays to determine self-tolerance.

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

Differences between tumor, blood and organ reconstitution of T cells (absolute number and percentage of total) will be determined by Kruskal-Wallis test using a Dunns post-test ($p < 0.05$) comparing all individual groups of each individual [REDACTED] line. T cell-reconstitution of PDX tumors compared to non-humanized mice (assessed by statistically significant differences) will be considered a success. For self-tolerance, tumor rejection as measured by graft survival will be determined (Kaplan Meier analysis).

B. The animals

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

Genetically altered animals from an established animal breeding company inside or outside the EU, maximum 420 mice, young adults.

From literature, immune deficient mice of ~4-8 weeks are preferable because of optimal grafting of [REDACTED] cells and PDX. For this study, female mice will be used. Female mice are preferable since our tissue is derived from human females and differences in (both human and animal) male and female immune systems have frequently been described (see e.g. Furman et al. PNAS 2013).

We will initially use the two BRCA-wt [REDACTED] lines with corresponding tumor. We will have several groups:

1. A control group for humanisation using [REDACTED] cells from [REDACTED] line 1 [REDACTED] implanted according to the optimal protocol established in appendix 1 or 2 [REDACTED]
2. A group implanted only with a PDX from the patient corresponding to [REDACTED]
3. A group implanted with [REDACTED] from [REDACTED] and implanted with the corresponding PDX1 [REDACTED]
4. A group implanted with [REDACTED] from [REDACTED] and the mismatched PDX from patient 2 [REDACTED]
5. A control group humanized using [REDACTED] cells from [REDACTED]
6. A group implanted only with [REDACTED]
7. A group implanted with [REDACTED] from [REDACTED] and implanted with the corresponding [REDACTED]
8. A group implanted with [REDACTED] from [REDACTED] and the mismatched PDX from patient 1 [REDACTED]

This will allow us to establish differences in immune reconstitution and effects of the tumor on immune cell function compared to non-tumor-bearing humanized mice.

The required group size will depend on the data from appendix 1 and 2, set at a maximum of 10 mice

per group (see appendix 1 and 2). Therefore, we will calculate here with the maximum of 10 mice per group, but this number may be lower depending on the outcome of appendix 1 and 2. Since we will compare implantation order of PDX implantation first or [redacted] implantation first, we will have 8(groups) x 2 [redacted] lines)= 16 groups in total. With a maximum of 10 mice per group this would mean 160 mice.

For each PDX model, we would therefore need tumor tissue for 30 mice (3 groups x 10 animals, see groups above). From our experience with ovarian cancer PDX models, we know we would need 3 successive passages to generate enough material for these 30 mice. In brief, tumor specimens of a patient will first be implanted in three mice (F1; 3 mice per patient). In our previous studies, we have observed a 68% take-rate for ovarian tumors. This means we need to implant 3 patient tumors in F1 in order to ensure material is available from 2 patients (3 x 3 = 9 mice). F1 tumors will be harvested and implanted into a second set of 3 mice (F2; 2 x 3 = 6 mice), harvested and re-implanted into another set of 5 mice (F3; 2 x 5 = 10 mice). F3 tumors are then harvested and split into 8 new fragments (40 fragments). Fragments are then implanted into the experimental mice (30) or biobanked for (genetic)analysis. In total, we would therefore need:

F1: 9 mice

F2: 6 mice

F3: 10 mice

Total: 25 mice per PDX model, 2 PDX models, so: 2 x 25 = 50 mice

Should the groups size described above be smaller, numbers will of course be adjusted down for the required number of tumor tissue fragments.

Should these humanization experiments prove successful (assessed by significantly increased T cell infiltration of the PDX tumors compared to non-humanized mice), we will validate these findings for 2 additional BRCA1/2-mutant [redacted] lines [redacted]

We will therefore have 2 pairs of [redacted] lines [redacted] For each pair a maximum of 50 animals are needed for generating tumor tissue for the experimental groups. For each pair, also a maximum of 160 animals are needed for the experimental groups.

Maximum number of animals needed is therefore: 2(pairs of [redacted] lines) x(50 + 160 animals) = 420

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:

We have already optimized [redacted] *in vitro*. However, true functionality [redacted] cannot be determined *in vitro* and *in vivo* experiments are needed for proof of function.

Reduction:

As discussed in appendix 1 and 2, T cell reconstitution after implantation of [redacted] cells has been reported in a number of publications with significant differences between sham- and [redacted] mice reported in each paper. However, group size and variation between animals differs between all papers (3-10 animals per group), potentially due to differences in [redacted] cells used.

The final number of animals needed for each group (to a maximum of 10) within this appendix is therefore dependent on the optimal number of animals identified in appendix 1 and 2. The minimum required number will obviously be selected for this procedure.

In addition, we have chosen to initially only compare reconstitution for two [REDACTED] lines, thereby reducing the maximum number of animals required.

Refinement:

We have extensive experience with the proposed animal procedures and optimal refinements of actions for this model are in place.

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

All procedures will be performed under general anaesthesia where required and adequate pain relief will be employed when necessary. Animals will be housed in groups with cage enrichment and food and drink will be administered ad libitum. Procedures will be limited to a minimum and when possible performed at the same time. Symptoms of pain, suffering and anxiety will be closely monitored by behavioral observations and by monitoring the weight of the animals and recorded in a welfare diary. For all experiments the standard code of practice Animals Experiment in Cancer Research will be followed. If loss of weight of more than 15% occurs, animals will be euthanized. Although it has not been reported in literature for [REDACTED] grafts, graft-versus-host disease (GvHD) might occur. Animals will be monitored especially closely for early signs of GvHD (skin lesions) and euthanized immediately upon early symptoms to spare further suffering. GMOs are handled under the applicable laws and safety standards for it.

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.

As described in appendix 1 and 2, to the best of our knowledge, no data is available on the humanization of PDX-bearing mice humanized using [REDACTED] derived from [REDACTED]. After completion of this procedure, we will actively disseminate our results to the scientific community to avoid unnecessary repetition of our experiments.

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.

Before surgery, [REDACTED] and PDX implantation, each animal will undergo full anesthesia. During surgery, each animal will receive pain medication (analgesia) intraoperatively to ensure reduction of pain after surgery and anesthesia recovery.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Tumor growth should never impair water/food intake or the animal's movement. However, in rare cases tumor growth could become invasive or ulceration of the tumor could take place. Graft-versus-host disease (GvHD) might occur that could result in discomfort.

Explain why these effects may emerge.

Depending on the growth characteristics of the patient tumor, invasive growth or ulceration due to the tumor could occur. [REDACTED]

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

The welfare is checked regularly and intensified when necessary. In this way we can detect fast tumor growth, ulceration at early stage to reduce suffering. If suffering of ulceration or invasive tumor growth reach level 4, animals will be sacrificed. GvHD is not expected to occur during the time-frames proposed here. Nevertheless, animals will be monitored especially closely for early signs of GvHD (skin lesions) and euthanized immediately upon early symptoms to spare mice further suffering.

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.

According to the standard code of practice Animals Experiment in Cancer Research, mice will be euthanized when an animal is no longer eating or drinking, excessive weight reduction (taken tumor growth into account) is observed, the tumor reaches a size of more than 10% of the total body weight, the total tumor size exceeds 2000 mm³, when a single tumor exceeds 1500 mm³, the tumor shows persistent ulceration, when tumor growth becomes invasive or when no tumor growth occurs within 6 months after implantation. Humane endpoints will also be applied when animals develop GvHD.

Indicate the likely incidence.

Weight loss of more than 15% of the body weight can occur after a surgical procedure, however this is rare. Tumors are unlikely to reach maximum size in these experiments. Based on literature, the occurrence of GvHD in the proposed time frame is unlikely to occur.

K. Classification of severity of procedures

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

The level of discomfort for the procedure described should be rated as moderate. Animals will experience mild discomfort due to handling, moderate discomfort due to implantation of ■■■ cells under renal capsule, or subcutaneously in scaffolds, moderate discomfort due to implantation and growth of a tumor, and induction and recovery from anaesthesia. Therefore the cumulative expected levels of discomfort will be classified as moderate. The highest level of discomfort from a single action is moderate.

Under anaesthesia subcutaneous implantation of tumor- moderate

Subcutaneous tumor growth for a couple of months- mild to moderate

Under anaesthesia implantation of ■■■ cells under renal capsule or subcutaneously- moderate

Handling of the animal for welfare evaluation- mild

Blood sampling – mild

Sacrificing under anaesthesia – non-recovery

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be terminated under general anaesthesia. This termination is essential for harvesting, organs for ex vivo analysis of T cell reconstitution.

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 **8081**
2. Titel van het project: **Generation, characterization and validation of immune-humanized Patient Derived Xenograft models as model for anti-cancer treatment**
3. Titel van de NTS: **Het ontwikkelen van muismodellen voor onderzoek naar patiënt-specifieke immunologische behandelmethoden tegen kanker.**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning**
 - wijziging van vergunning met nummer
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 **15-02-2017**
 - termijnonderbreking(en) van / tot **20-01-2017 tot 13-02-2017**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag **13-02-2017**
 - advies aan CCD: **24-02-2017**
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. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie 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 **20-01-2017**

- **Vragen/opmerkingen t.a.v. uw aanvraag/bijlage**

- 1/ In bijlagen 1-2 wordt frequentie, methode en volume van bloedsampling niet gespecificeerd, er staat alleen "multiple times". Dit zou nader beschreven moeten worden.
- 2/ In bijlage 3 staat tail vein, met intervals gebaseerd op bijlagen 1-2, dan moet het vaststellen van sampling intervals in die bijlagen als uitkomst parameter gedefinieerd worden
- 3/ De aanvragers zijn erg "zuinig" in aangevraagde aantallen. Als een experiment door onvoorziene omstandigheden faalt, is er een reëel risico dat hele aanvraag te krap is ingezet. In kader van robuustheid of reproduceerbaarheid is een eventueel validatie/herhalings experiment verdedigbaar.
- 4/De startdatum van het project, weergegeven in het aanvraagformulier, staat op 1-2-2016. De DEC neemt aan dat dit 2017 is zou moeten zijn

-

- Datum antwoord:**05-02-2017**

- Verstrek(e) antwoord(en):

1/ In bijlage 1-2 is de specificatie "multiple times" in onderdeel A vervangen door de zin: "T cell reconstitution (and phenotype) in these mice will be monitored in the blood by retro-orbital sampling of 100uL before and at 6 week intervals after implantation."

2/ In lijn met het antwoord op vraag 1 is in bijlage 3 de specificatie: "at intervals determined to be optimal from experiments in appendix 1 and 2" vervangen door de zin: "T cell reconstitution (and phenotype) in these mice will be monitored in the blood by retro-orbital sampling of 100uL before and at 6 week intervals after implantation."

3/ De robuustheid van het systeem wordt naar onze mening al voldoende getest door het gebruik van meerdere ■ lijn en behoeft in dit geval geen extra muizen. In het kader van reproduceerbaarheid is een herhalingsexperiment met alle ■ lijnen en de ■ toegevoegd in bijlage 1 van de aanvraag in sectie B als volgt: "We will repeat each experiment twice to establish the reproducibility of our experiments." De benodigde aantallen muizen zijn hierop aangepast in de gehele aanvraag.

4/Correct. Dit is gecorrigeerd in het aanvraagformulier.

- **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)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. **Ja**
Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag / een wijziging op een bestaande vergunning. **Nieuwe aanvraag**
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. **N.v.t.**

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*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 Wet Natuurbescherming).

Voor zover de DEC de mogelijke tegenstrijdigheid kan beoordelen is er geen aanleiding om deze strijdigheid met andere relevante wettelijke bepalingen aanwezig te achten. De DEC wil wel vooropstellen dat deze signaleringsfunctie niet tot de taken van de DEC behoort.

3. Beoordeel of de in de projectaanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) aansluit(en) bij de hoofddoelstelling. Nevendoelstellingen van beperkt belang hoeven niet te worden aangekruist in het projectvoorstel. **De doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstelling.**

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische*

handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld).

Het directe doel is om een immuno-competent patiënt-afkomstig xenograft (PDX) model voor kanker op te zetten om nieuwe immuuntherapeutische strategieën te kunnen testen. Het uiteindelijke doel is om voor mensen betere behandelmethoden tegen kanker te ontwikkelen. Er is deels directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel: de kankercellen die het xenograft vormen in het model zijn afkomstig van mensen. 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/translatieele project zijn de proefdieren, en patiënten.

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. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

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 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 huisvesting en verzorging volgens de richtlijn gebeurt. Dit op basis van de daartoe strekkende verklaring van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 van de ondertekening van de aanvraag en punt F van de bijlage.**

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). **Dit is goed ingeschat. 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 implantatie van humane cellen, bloedafname 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 interactie tussen immuun cellen en tumorcellen zijn alleen in vivo na te bootsen**

15. Beoordeel of het aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en of er een heldere strategie is om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **Naar de mening van de DEC is het aantal te gebruiken dieren realistisch ingeschat en wel zodanig dat niet meer dan nodig, maar ook niet minder dan nodig dieren worden gebruikt voor het behalen van een betrouwbaar wetenschappelijke resultaat, zulks mede gebaseerd op de door de aanvrager aangeleverde literatuur referenties**

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 in haar beoordeling betrokken.**

16. 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

17. 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.**
18. 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: dieren**

worden gedood voor uitname van te analyseren weefsels.

19. 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

20. 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 "**Generation, characterization and validation of immune-humanized Patient Derived Xenograft models for anti-cancer treatment**", dat gericht is op de ontwikkeling van een gehumaniseerd xenotransplantatie muis model voor eierstok kanker en daarmee de mogelijke van de ontwikkeling van nieuwe therapieën voor de behandeling van kanker patiënten het matige ongerief, dat de muizen wordt aangedaan 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 biomedische kennis met betrekking tot het ontwikkelen van een xenotransplantatiemodel in een muis met een gehumaniseerd immuunsysteem, 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 "**Generation, characterization and validation of immune-humanized Patient Derived Xenograft models for anti-cancer treatment.**" 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 [REDACTED] cellen, al dan niet in combinatie met tumor weefsel transplantatie en implantatie van [REDACTED]. De dieren worden gemonitord en blootgesteld aan herhaalde bloedafname, 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 modellen om immunotherapie te ontwikkelen tegen kanker bij mensen. Voor de kanker patiënten is verbetering van hun welzijn en mogelijk uitzicht op werkzame, nieuwe therapie van groot belang.

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 "**Generation, characterization and validation of immune-humanized Patient Derived Xenograft models for anti-cancer treatment.**", dat gericht is op de ontwikkeling van een nieuw xenotransplantatie muis model voor de ontwikkeling van anti-kanker therapie, de opoffering en het 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 ondergane 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 "**Generation, characterization and validation of immune-humanized Patient Derived Xenograft models for anti-cancer treatment.**" 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 kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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
AVD105002017883

Bijlagen

2

Datum 24 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 24 februari 2017. Het gaat om uw project "Generation, characterization and validation of immune-humanized Patient Derived Xenograft models for anti-cancer treatment.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002017883. 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:

24 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD105002017883

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
24 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD105002017883

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: ██████████
KvK-nummer: 1179037
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN
IBAN: NL45ABNA0474567206
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
24 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD105002017883

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 februari 2017
Geplande einddatum: 1 februari 2022
Titel project: Generation, characterization and validation of immune-humanized Patient Derived Xenograft models for anti-cancer treatment.
Titel niet-technische samenvatting: Het ontwikkelen van muismodellen voor onderzoek naar patiënt-specifieke immunologische behandelmethoden tegen kanker.
Naam DEC: DEC-RUG
E-mailadres DEC:

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

Ondertekening

Naam:



Functie:



Plaats:

GRONINGEN

Datum:

24 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD105002017883



> 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
AVD105002017883

Bijlagen

2

Datum 24 februari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 24 februari 2017
Vervaldatum: 26 maart 2017
Factuurnummer: 170883

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002017883	€ 1.541,00

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



> 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
AVD105002017883

Datum 3 maart 2017

Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 24 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Generation, characterization and validation of immune-humanized Patient Derived Xenograft models for anti-cancer treatment." met aanvraagnummer AVD105002017883. 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

Er zijn twee administratieve vragen:

In de NTS zijn een aantal woorden aan elkaar geschreven. Pas dit aan en stuur een nieuwe NTS in.

U gebruikt dieren met een verzwakt immuunsysteem. Wat wordt gedaan om gezondheidsproblemen als gevolg van de immunodeficientie van de dieren te voorkomen.

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:

3 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD105002017883

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.



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: Rijksuniversiteit Groningen

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD105002017883

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:

3 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD105002017883

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

Antwoorden op aanvullende vragen van aanvraag AVD105002017883: "Generation, characterization and validation of immune-humanized Patient Derived Xenograft models for anti-cancer treatment."

Communicatie van de CCD:

In de NTS zijn een aantal woorden aan elkaar geschreven. Pas dit aan en stuur een nieuwe NTS in.

Onze reactie:

Dit is aangepast.

Communicatie van de CCD:

U gebruikt dieren met een verzwakt immuunsysteem. Wat wordt gedaan om gezondheidsproblemen als gevolg van de immunodeficiëntie van de dieren te voorkomen.

Onze reactie:

Om gezondheidsproblemen als gevolg van de immunodeficiëntie te voorkomen wordt gebruik gemaakt van maatregelen zoals huisvesting onder IVC omstandigheden, werken met de dieren in een laminair flowkast, gebruik van geautoclaveerd water en sterilisatie van materiaal waarmee de dieren in aanraking komen. Het CDP Groningen heeft uitvoerig ervaring met het huisvesten van immunodeficiëntie dieren en onze onderzoeksgroep heeft de beschreven handelingen in het verleden ook succesvol uitgevoerd onder steriele condities in de flowkast (implanteren van PDX, etc.) Wij verwachten hier dan ook geen aanvullende problemen.



> 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

AVD105002017883

Bijlagen

1

Datum 3 april 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 24 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Generation, characterization and validation of immune-humanized Patient Derived Xenograft models for anti-cancer treatment." met aanvraagnummer AVD105002017883. 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 "Generation, characterization and validation of immune-humanized Patient Derived Xenograft models for anti-cancer treatment." starten. De vergunning wordt afgegeven van 4 april 2017 tot en met 1 februari 2022.

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 24 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.

Datum:
3 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD105002017883

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:



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 4 april 2017 tot en met 1 februari 2022, voor het project "Generation, characterization and validation of immune-humanized Patient Derived Xenograft models for anti-cancer treatment." met aanvraagnummer AVD105002017883, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Hoogleraar. Voor de uitvoering van het project is Analist verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

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

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
1: Humanizing immune-deficient mice through [REDACTED]				
	Muizen (Mus musculus) / genetisch aangepaste dieren	120	100% Matig	
2: Optimizing humanization [REDACTED]				
	Muizen (Mus musculus) / genetisch aangepaste dieren	70	100% Matig	
3: Establishing immune-humanized PDX models of ovarian cancer				
	Muizen (Mus musculus) / genetisch aangepaste dieren	420	100% Matig	

Aanvraagnummer:

AVD105002017883

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:

AVD105002017883

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:

AVD105002017883

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 W17-09									
nr.	document NTS 2017884	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	NTS	x							
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlage animal procedure			x					
5	Ontvangstbevestiging en factuur				x		x	x	
6	DEC advies				x		x	x	
7	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x	
8	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x	
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	



01 MAART 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.	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 type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	(Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input 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	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
	Functie	
	Afdeling	
	Telefoonnummer	
	E-mailadres	
1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Stuur dan het ingevulde formulier <i>Melding Machtiging</i> mee met deze aanvraag	
	<input type="checkbox"/> Nee	

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?	Startdatum	1 - 3 - 2017
	Einddatum	1 - 3 - 2022
3.2 Wat is de titel van het project?	Precies-gesneden plakjes weefsel als alternatieve methode om blootstelling, metabolisme en toxiciteit van geneesmiddelen en andere chemicaliën te onderzoeken in proefdieren en de mens	
3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?	Een alternatief voor het testen van bijwerkingen van geneesmiddelen en schadelijke effecten van chemicaliën: precies gesneden plakjes van organen van proefdieren en de mens.	
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



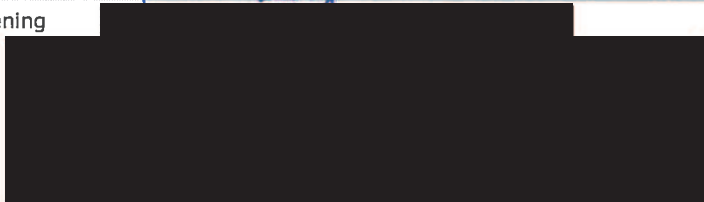
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1035 Lege
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
 Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven 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	27 - 02 - 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.

Voordat geneesmiddelen in klinische studies aan mensen worden toegediend, is er een wettelijke verplichting om naast de farmacologische effecten ook de schadelijke effecten vast te stellen in twee proefdiersoorten. Ook voor chemicaliën die op de markt komen moeten deze effecten worden vastgesteld.

Onzekerheden van de voorspellende waarde van dierproeven

De toxiciteit van chemische stoffen wordt enerzijds bepaald door de blootstelling aan die stof en anderzijds door de eigenschappen van de stof zelf alsmede van de door het lichaam gevormde metabolieten. Omdat verschillen hierin tussen mensen en proefdieren groot kunnen zijn en per stof verschillend zijn, is de onzekerheid bij de voorspelling van proefdier naar de mens erg groot. Daarom worden toxiciteitstesten in meer dan één proefdiersoort uitgevoerd en wordt een veiligheidsmarge van een factor 10 ingebouwd bij de risicobeoordeling. Deze veiligheidsmarge houdt toch nog veel onzekerheden in en is geen garantie voor een goede voorspelling voor de mens.

Ontwikkeling van alternatieven voor dierproeven.

Voor dit toxicologisch onderzoek worden wereldwijd veel proefdieren gebruikt die veel ongerief voor de dieren opleveren wanneer hoge, toxische doseringen worden toegediend. Al 40 jaar wordt daarom onderzocht in hoeverre deze *in vivo* toxiciteitsproeven kunnen worden vervangen door *in vitro* alternatieven. In het artikel van B. Blaauboer (*Toxicology* 332: 4-7, 2015) wordt hiervan een overzicht gegeven. Belangrijke aspecten hierbij zijn dat in de *in vitro/ex vivo* cel- en weefselmodellen de metabole en transportfuncties van het orgaan goed gereflecteerd moeten blijven, omdat zowel de intracellulaire blootstelling alsmede de vorming van toxische metabolieten een uiterst belangrijke rol spelen bij het uiteindelijke toxische effect.

Precies-gesneden weefselplakjes als ex vivo model.

Onze werkgroep heeft in de afgelopen decennia het *ex vivo* model van precies-gesneden weefsel plakjes (PCTS, precision-cut tissue slices) ontwikkeld en aangetoond dat PCTS gemaakt van de ratten-, muizen en humane lever en darm de toxiciteit van stoffen goed kunnen voorspellen. [REDACTED]

[REDACTED] De procedure van het maken en incuberen van deze PCTS is door ons op uitnodiging gepubliceerd in Nature Protocols. [REDACTED]

[REDACTED] Ook hebben we deze techniek toegepast op long- en nierweefsel (*Oenema et al PLoS One*, 8:e65580, 2013; *Bertrand et al., Inorg Chem.* 53: 2296-2303, 2014). Daarnaast hebben we voor verschillende toxische stoffen het mechanisme van toxiciteit bestudeerd en vastgesteld dat bekende *in vivo* mechanismen van deze stoffen in slices gereflecteerd worden (*Vatakuti et al., Toxicol In Vitro.* 29:1012-20.2015, *Vatakuti et al., Chem Res Toxicol.* 2016 21;29(3):342-51; *Vatakuti et al, Arch Toxicol.* 2016 Jun 25. *in press*). Onlangs hebben we de incubatie-omstandigheden van humane lever PCTS zodanig kunnen optimaliseren dat de vitaliteit en functionaliteit gedurende 5 dagen behouden blijft (*Starokozhko et al Arch Toxicol.* 2016 *in press*; *Starokozhko et al Toxicol In Vitro.* 30: 288-299, 2015). Voor PCTS van nier, darm en long weefsel is de vitaliteit tot 24-48 uur aangetoond. PCTS van lever, darm, nier en long van ratten en muizen worden nu in onze werkgroep routinematig ingezet binnen verschillende wetenschappelijke projecten binnen de werkgroep en in samenwerkingsprojecten met andere werkgroepen binnen ons instituut. PCTS van de lever van de hond en minipig zijn incidenteel toegepast. Met organen van konijnen hebben we in ons instituut nog geen ervaring maar in de literatuur wordt toepassing hiervan wel gerapporteerd.

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 uiteindelijke doel van het huidige onderzoeksvoorstel is om door middel van het gebruik van PCTS een betere voorspelling van blootstelling en toxiciteit van chemische stoffen voor de mens mogelijk te maken en tegelijkertijd het proefdiergebruik hiervoor te reduceren, het dierenleed te verminderen en uiteindelijk het gebruik van proefdieren zoveel mogelijk te vervangen. Of en wanneer de nu nog wettelijk voorgeschreven dierproeven volledig kunnen worden vervangen is op dit moment onduidelijk en zal onder meer afhangen van acceptatie van de alternatieven door de regelgevers.

De directe doelstellingen van dit project zijn:

1. De ontwikkelde techniek van het maken en incuberen van precies-gesneden weefselplakjes (PCTS) verder optimaliseren, met name voor darm, long en nier om subchronische blootstelling (>48 h) mogelijk te maken.
2. De blootstelling en acute en subchronische toxiciteit van verschillende potentieel schadelijke stoffen in de verschillende organen (lever, darm, nier en long) te bepalen en het mechanisme ervan vast te stellen middels de techniek van PCTS.
3. De verschillen tussen proefdierspecies en de mens met betrekking tot toxiciteit en blootstelling van geneesmiddelen en andere chemische stoffen in kaart te brengen, alsmede het verschil tussen mannelijke en vrouwelijke proefdieren en het mechanisme achter deze verschillen te onderzoeken.

Beschikbare onderzoeksfaciliteiten.

De onderzoeksgroep heeft jarenlange ervaring met het PCTS model en er is een speciale slice-faciliteit aanwezig. Hier zijn meerdere slicers en verschillende incubatiesystemen aanwezig en wordt intensief samengewerkt met andere onderzoeksgroepen die met dit model werken. De capaciteit is ruim voldoende. Ook de faciliteiten voor de analyses van vitaliteit, metabole functie, transport functie en mechanismen van toxiciteit zijn in ruime mate voorhanden. Zo is er een Massaspectrometrie centrum, faciliteiten voor microarray en proteomics analyse en een imaging centrum.

Beperking van het aantal proefdieren.

Door zoveel mogelijk de experimenten van verschillende projecten tegelijkertijd uit te voeren op de verschillende organen van het proefdier kan zo efficiënt mogelijk gebruik gemaakt worden van ieder proefdier. Door een goede planning van de experimenten kan het aantal proefdieren zo laag mogelijk worden gehouden. Dit is een standaard procedure in onze werkgroep en iedere onderzoeker neemt door de planning van de experimenten op elkaar af te stemmen, mede de verantwoordelijkheid hiervoor, wat de bewustwording van de onderzoekers voor het gebruik van proefdieren bevordert.

3.3 Belang

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

Het is wetenschappelijk en maatschappelijk van groot belang om de mechanismen van toxiciteit te onderzoeken omdat dat de mogelijkheden biedt om een beargumenteerde risicoafweging te maken, species verschillen te begrijpen om een betere translatie naar de mens te kunnen doen en maatregelen te ontwikkelen die deze toxiciteit kunnen voorkomen of kunnen behandelen.

Een tweede maatschappelijk belang is het verder ondersteunen van het belang van *in vitro/ex vivo* testen als vervanging voor *in vivo* testen, en het verder terugdringen van het proefdiergebruik.

Een degelijke onderbouwing van het gebruik van PCTS als model voor toxiciteitstesten en van het vaststellen van species verschillen, zal het gebruik van humaan weefsel kunnen bevorderen en maatschappelijke acceptatie daarvan zal leiden tot een betere beschikbaarheid van dit humane weefsel.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

1. *De ontwikkelde techniek verder te optimaliseren, met name voor darm, long en nier*
Onderzocht zal worden of verbetering in de samenstelling van het incubatiemedium de vitaliteit van darm, nier en long PCTS kan worden verlengd tot 5 dagen. Hiertoe zullen diverse commercieel verkrijgbare media worden gebruikt voor PCTS incubaties. Daarnaast zullen diverse additieven aan het incubatiemedium worden toegevoegd, waarmee we proberen aan te grijpen op verschillende processen die cellulaire stress veroorzaken, zoals ischemie-reperfusie. Als controle medium zal het incubatiemedium worden gebruikt dat sinds jaren in onze groep wordt gebruikt voor incubatie van slices. Het succes van de interventie zal worden uitgelezen met verschillende parameters, i.e. biotransformatie activiteit (geneesmiddel metabolisme), markers voor oxidatieve stress, vitaliteitsparameter (ATP gehalte, lekkage van cellulaire enzymen), histomorfologie.
2. *De ontwikkelde techniek toe te passen om blootstelling en toxiciteit van verschillende potentieel schadelijke stoffen in verschillende organen te bepalen en het mechanisme ervan vast te stellen*
Te onderzoeken stoffen: In samenwerking met onderzoekers die geneesmiddelen synthetiseren worden derivaten van antikanker middelen als cisplatina en auranofin gesynthetiseerd waarna de toxiciteit van die nieuwe verbindingen getest wordt op kanker cellijnen en PCTS van de verschillende organen. Ook wordt het mechanisme van de levertoxiciteit van enkele biociden onderzocht. In het vervolg op ons onderzoek naar cholestatische effecten van stoffen (*Vatakuti et al, Chem Res Toxicol., 29, 342-51 2016*; *Starokozhko et al submitted*) wordt het mechanisme van cholestase door geneesmiddelen onderzocht. In samenwerking met de andere onderzoekers in onze werkgroep worden de mechanismen van opname van nanoparticles onderzocht. Voor al deze stoffen zullen PCTS worden blootgesteld aan verschillende concentraties van deze stoffen waarna de vitaliteit van de slices gemeten wordt, om TC50s te bepalen. Specifieke mechanismen van toxiciteit zullen vervolgens worden onderzocht door te kijken naar expressie van specifieke genen (mRNA en eiwit) en/of door remming van specifieke pathways. Deze experimenten zullen in eerste instantie in PCTS van ratten en menselijk weefsel worden uitgevoerd.
3. *De ontwikkelde techniek toe te passen om van verschillende toxische stoffen de verschillen tussen proefdierspecies en tussen mannelijke en vrouwelijke dieren in kaart te brengen, alsmede het mechanisme achter deze verschillen.*

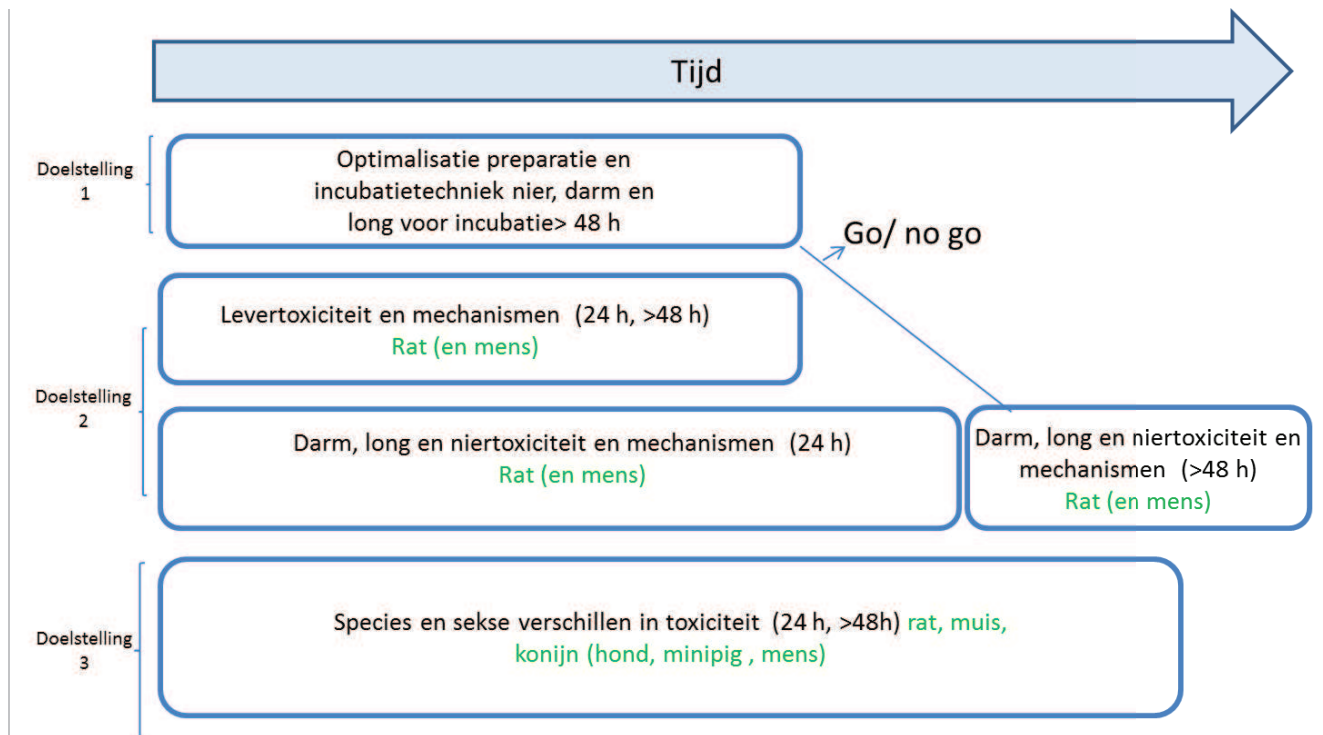
Onder doelstelling 2 genoemde experimenten zullen worden uitgebreid naar andere diersoorten (muis, konijn, hond, mini-pig, mens) en beide seksen om species- en sekseverschillen vast te stellen en het mechanisme ervan te belichten. Organen van honden en minipigs zullen betrokken worden uit onderzoek elders in Nederland en maken daarom geen deel uit van de projectaanvraag.

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

Voor alle projectonderdelen en voor alle aangevraagde diersoorten zal het zelfde type dierproef worden gebruikt: de dieren worden onder narcose gebracht waarna excisie van de benodigde organen zal plaatsvinden en het dier door verbloeden overlijdt.

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

Het meten van de acute toxiciteit (gedurende 24-48 uur) en van de opname/blootstelling zal voor meerdere stoffen parallel worden uitgevoerd om zo efficiënt mogelijk van alle organen gebruik te maken. Zodra de experimenten ter optimalisatie van de incubatie aangeven dat ook de nier, long en darm langer dan 48 uur in leven blijven, zal langdurige (48-120 uur) blootstelling van nier, long en darm aan de toxische stoffen wordt onderzocht (zie road map).



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

Volgnummer	Type dierproef
1	Het verzamelen van organen uit verschillende diersoorten voor ex vivo toxiciteitsstudies
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
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	3.4.4.1	Het verzamelen van organen uit verschillende diersoorten voor ex vivo toxiciteitsstudies

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

De experimentele opzet van de dierproef bestaat uit het onder narcose brengen van het proefdier, waarna de organen worden uitgenomen en het proefdier overlijdt door verbloeden.

Van de organen worden precies-gesneden plakjes (precision-cut tissue slices, PCTS) gemaakt die *ex vivo* aan verschillende concentraties van de te onderzoeken stoffen worden blootgesteld waarna geselecteerde biomarkers die de mate van toxiciteit en het mechanisme van toxiciteit reflecteren worden gemeten en functionele testen worden uitgevoerd. Voor vitaliteit wordt het ATP gehalte, lekkage van Lactaatdehydrogenase (LDH) en morfologie gebruikt. Daarnaast worden per orgaan verschillende specifieke biomarkers gebruikt waaronder expressie van toxiciteit-gerelateerde genen op mRNA en eiwit niveau middels RT-PCR, microarray, western blotting en immunohistochemie.

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 narcose worden de organen uitgenomen, waarna het proefdier overlijdt door verbloeden

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

Uit onze ervaring met de techniek van PCTS is gebleken dat voor statistisch betrouwbare metingen van effecten op vitaliteit, metabolisme functie of gen expressie 4-5 proefdieren nodig zijn, waarbij binnen ieder experiment alle experimentele waarnemingen in drievoud (3 slices per stof, per uitleesparameter en per concentratie) worden gedaan. Het aantal experimenten dat per orgaan (lever, nier, darm long) kan worden uitgevoerd, verschilt per orgaan: zo kunnen bijvoorbeeld van een rattenlever 150 slices worden gemaakt, van een

Van een muizenlever 40, van twee rattennieren ca. 80, van 2 muizennieren ca 30 en van rattendarmen ca 60 per regio (duodenum, jejunum, ileum en colon). Door het werk zodanig te organiseren dat meerdere onderzoekers tegelijk hun experimenten uitvoeren met de verschillende organen van een proefdier, kan zeer efficiënt gebruik gemaakt worden van ieder proefdier en kan het aantal proefdieren tot een minimum worden beperkt.

B. De dieren

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

De experimenten voor doelstelling 1 en 2 zullen met organen van mannelijke ratten worden uitgevoerd, omdat we daarmee voortbouwen op ons eerdere werk dat in mannelijke dieren is gedaan, tenzij het onderzoeksdoel specifiek op vrouwelijke dieren is gericht. We verwachten niet dat de incubatie omstandigheden per sekse zullen verschillen. Bij doelstelling 3 zullen van alle diersoorten in pilot experimenten zowel mannelijke als vrouwelijk dieren worden gebruikt. In principe worden volwassen dieren gebruikt.

Voor de proeven behorende bij doelstelling 1 en 2 (zie projectvoorstel) zullen voornamelijk organen van ratten worden gebruikt (naast menselijke organen). Alle experimenten worden met organen van 5 dieren uitgevoerd (n=5 biological replicates). 30 potentieel toxische stoffen worden onderzocht.

Voor elke stof wordt het volgende bepaald:

- Toxiciteit en opname in rat PCTS bij verschillende concentraties (5 concentraties, 5 uitleesparameters die het mechanisme van toxiciteit en de mate ervan reflecteren, op 2 tijdstippen (acuut 3 of 24 h of sub-chronisch >48 h), 3 slices per groep= 150 slices= 1 rat)
- Toxiciteit en opname na interventie om het mechanisme te bevestigen in rat PCTS (2 concentraties, 2 tijdstippen, 4 uitleesparameters, 3 interventies, 3 slices per groep= 144 slices=1 rat)

Totaal zullen voor doelstelling 1 en 2 dus 30 (stoffen) x2 (type experimenten) x 5 (biological replicates)= 300 ratten nodig zijn. Voor experimenten om de incubatiemethode voor darm, nier en long te verbeteren worden geen extra dieren aangevraagd, omdat deze organen gebruikt kunnen worden uit dezelfde experimenten die hierboven voor lever beschreven zijn. Naar verwachting zullen ook een deel van de inter-orgaan vergelijkingen met dezelfde dieren kunnen worden uitgevoerd. Omdat van rattennieren, longen en darmen minder slices gemaakt kunnen worden dan van de lever zullen hiervoor extra dieren nodig zijn. Hiervoor worden 100 dieren extra aangevraagd (fig 1).

Voor 5 (van de bovengenoemde 30 potentieel toxische stoffen) wordt de toxiciteit en het mechanisme ervan in beide seksen van verschillende species vergeleken. De ondergenoemde species zijn geselecteerd omdat ze frequent gebruikt worden voor toxiciteitsstudies in de chemische- en farmaceutische industrie (fig. 1).

Omdat het totaal aantal slices dat uit een lever kan worden geprepareerd per diersoort verschilt zullen er 2 muizen nodig zijn per stof (totaal 200 dieren, 5 (stoffen) x 2 (muizen per stof) x2 (sekse) x2 (type experiment) x 5 (biologische replicates), terwijl er 2 stoffen kunnen worden getest met een konijnenlever (totaal 50 dieren). De experimenten met mannelijke ratten zijn meegenomen in de proeven beschreven voor doelstelling 1 en 2. Voor doelstelling 3 worden daarnaast nog 5 (stoffen) x2 (type experimenten) x 5 (biological replicates)= 50 vrouwelijke ratten aangevraagd.

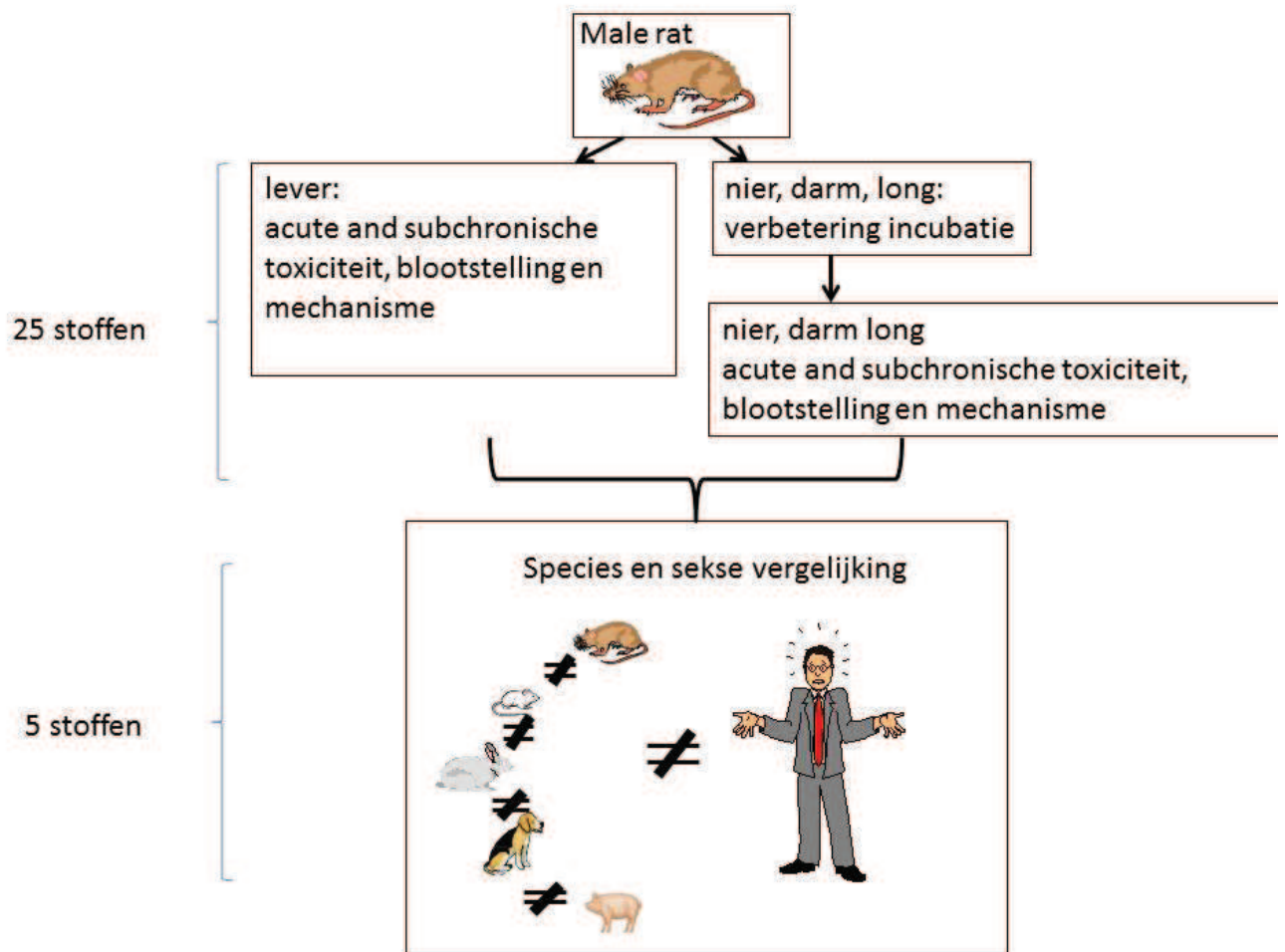


Fig. 1 Schematische voorstelling van de uit te voeren experimenten

Ratten: 450, Herkomst: erkende leverancier Europa

Muizen: 200, Herkomst erkende leverancier Europa

Konijnen: 50 . Herkomst erkende leverancier Europa . Hiervoor zal zoveel mogelijk worden samengewerkt met andere instituten in Nederland, waarbij organen worden verkregen uit controle dieren, die worden gedood in het kader van een experiment.

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.

VERMINDEREN:

Het gehele onderzoek is gebaseerd op de doelstelling om dierproeven te verminderen door gebruik te maken van het *ex vivo* model van PCTS. Hierdoor kunnen per dier een groot aantal variabelen worden getest, die even zoveel *in vivo* experimenten kunnen vervangen. Ook worden alle experimenten van onze werkgroep zo gepland dat alle organen van het proefdier optimaal worden gebruikt. De keuze van de dieren is gebaseerd op de meest gebruikte proefdieren in het geneesmiddel onderzoek. Voor de muizen en ratten zullen speciaal voor dit project aangeschafte dieren worden gebruikt. Konijnen zullen alleen worden aangeschaft als geen gebruik kan worden gemaakt van orgaanmateriaal van konijnen die elders in Nederland worden gedood in het kader van een experiment maar waarvoor deze organen niet worden gebruikt. Er zijn minder konijnen dan ratten aangevraagd omdat we verwachten dat de organen groter zijn en we het werk zo willen organiseren dat alle medewerkers dan meewerken aan de experimenten, om het beschikbare weefsel optimaal te gebruiken. Het gebruik van slachthuis materiaal of orgaanmateriaal van wild geschoten dieren is voor dit project niet mogelijk om verschillende redenen. In de eerste plaats is het bekend dat weefsel afkomstig van "non-heart beating donors" door ischemische processen snel aan kwaliteit verliest, wat consequenties kan hebben voor de vitaliteit van de weefselslices. Alleen al hersendood veroorzaakt veranderingen in de fysiologie wat kan leiden tot achteruitgang in de kwaliteit van weefsel (D. W. McKeown et al, Br J Anaesth (2012) 108 (suppl_1): i96-i107). De proefdieren die wij gebruiken als "orgaan donor" zijn nog in leven (onder narcose) op het moment dat de organen worden uitgenomen. Een andere belangrijke reden om terughoudend te zijn met slachthuis/wild geschoten materiaal is dat de genoemde diersoorten (varken en vos) geen deel uitmaken van het standaard arsenaal proefdieren in de farmaceutische industrie en dat er dus ook weinig over bekend is in de literatuur. Overigens is bij wild geschoten dieren/slachthuis materiaal standaardisatie vrijwel onmogelijk. Helaas is uit eerder onderzoek gebleken dat cryopreservatie van weefsel plakjes (nog) niet mogelijk is zonder verlies van vitaliteit, waardoor experimenten alleen met vers weefsel gedaan kunnen worden.

VERVANGING:

Het streven is naar volledige vervanging door de methode ook toe te passen op humaan weefsel. Echter dit is om twee redenen nog niet mogelijk: in de eerste plaats is het humane weefsel nog in onvoldoende mate beschikbaar. Aan verbetering hiervan wordt middels een landelijke commissie gewerkt. In de tweede plaats zijn dierproeven voor het testen van geneesmiddelen nog wettelijk voorgeschreven. Het in dit project gebruikte model biedt wel de mogelijkheid om de beste keus van het meest op de mens lijkende proefdiersoort te maken door vergelijking van resultaten van dierlijk weefsel met dat van de mens. Dit kan zo bijdragen aan het voorkomen van het gebruik van proefdieren waarvan de resultaten niet goed naar de mens te vertalen zijn. Het gebruik van cellen gedifferentieerd uit stamcellen en organoiden gemaakt van stamcellen is in opkomst voor toxiciteitstesten en zal waarschijnlijk in de nabije toekomst kunnen worden toegepast. Echter deze organoiden zullen voorlopig niet de complexe structuur van de organen met al hun verschillende celtypen in de weefselspecifieke onderlinge lokalisatie kunnen reflecteren en het PCTS model zal een plaats blijven innemen tussen de *in vivo* en *in vitro* modellen.

VERFIJNING:

Omdat de handelingen aan de dieren beperkt blijven tot onder narcose brengen, zijn geen extra maatregelen voor verfijning overwogen. Wel wordt bijgedragen aan verfijning door de toxicologische testen *in vitro* uit te voeren waardoor de dieren niet aan de effecten van deze toxische stoffen worden blootgesteld.

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.

Door de uitstekende verzorging in de proefdierfaciliteiten van de RUG en de ervaring van de medewerkers om het onder narcose brengen van proefdieren zo stressvrij mogelijk te doen, is de kans op pijn, lijden of angst tot een minimum beperkt. Er zijn geen nadelige invloeden op het milieu 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.

Dit type onderzoek is al jaren een belangrijke onderzoekslijn van onze werkgroep. Door de vele medewerkers die hieraan werken wordt voortdurend de literatuur doorzocht om uit te sluiten dat werk van anderen wordt gedupliceerd. Ook houden we op congressen en via andere kanalen voortdurend contact met onderzoekers in het veld. We doen het uiterste om te zorgen dat de resultaten van ons werk worden gepubliceerd zodat ook anderen geen werk gaan dupliceren.

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.

Pijn wordt voorzien bij de excisie van de organen, daarom wordt narcose toegepast. Gezien de aard en duur van de ingreep is de anesthesie voldoende om pijn bij het uitnemen van organen te voorkomen.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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.

terminaal

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

Door uitname van de organen verbloeden de dieren en hebben ze geen kans op overleving

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

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
AVD105002017884

Bijlagen

2

Datum 27 februari 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 24 februari 2017. Het gaat om uw project "Precies-gesneden plakjes weefsel als alternatieve methode om blootstelling, metabolisme en toxiciteit van geneesmiddelen en andere chemicaliën te onderzoeken in proefdieren en de mens". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002017884. 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:

27 februari 2017

Aanvraagnummer:

AVD105002017884

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
27 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD105002017884

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 1179037
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan 1
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN
IBAN: NL45ABNA0474567206
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
27 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD105002017884

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 maart 2017
Geplande einddatum: 1 maart 2022
Titel project: Precies-gesneden plakjes weefsel als alternatieve methode om blootstelling, metabolisme en toxiciteit van geneesmiddelen en andere chemicaliën te onderzoeken in proefdieren en de mens
Titel niet-technische samenvatting: Een alternatief voor het testen van bijwerkingen van geneesmiddelen en schadelijke effecten van chemicaliën: precies gesneden plakjes van organen van proefdieren en de mens.
Naam DEC: DEC-RUG
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.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: Groningen
Datum: 24 februari 2017

Datum:
27 februari 2017
Aanvraagnummer:
AVD105002017884



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

[REDACTED]
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
AVD105002017884

Bijlagen

2

Datum 27 februari 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 27 februari 2017
Vervaldatum: 29 maart 2017
Factuurnummer: 170884

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002017884	€ 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.

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 **8082**
2. Titel van het project: **Precies-gesneden plakjes weefsel als alternatieve methode om blootstelling, metabolisme en toxiciteit van geneesmiddelen en andere chemicaliën te onderzoeken in proefdieren en de mens**
3. Titel van de NTS: **Een alternatief voor het testen van bijwerkingen van geneesmiddelen en schadelijke effecten van chemicaliën: precies gesneden plakjes van organen van proefdieren en de mens.**
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning**
 - wijziging van vergunning met nummer
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 **16-02-2017**
 - termijnonderbreking(en) van / tot **20-01-2017 tot 05-02-2017**
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
 - aanpassing aanvraag **05-02-2017**
 - advies aan CCD: **24-02-2017**
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. Bij vragen die gericht zijn op het compleet maken van de aanvraag (aanvullingen achtergrond informatie 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 **20-01-2017**

- **Vragen/opmerkingen t.a.v. Projectvoorstel:**
- 1/ De titel leest wat moeilijk en is afwijkend van die in de NTS.
- 2/ Het betreft translationeel onderzoek, de DEC vraagt zich af of er ook niet een element van fundamenteel onderzoek in zit.
- 3/ Onderzoeksstrategie is goed beschreven. Een 'road map' en met duiding van go-no go momenten is echter wel gewenst.

- **Vragen/opmerkingen t.a.v. Bijlage 1:**
- 4/ Dieren: voor experimenten 1 en 2 (resp. doelstellingen 1 en 2) worden alleen mannelijke dieren gebruikt, tenzij uit experiment 3 (doelstelling 3) blijkt dat er een verschil (aannemelijk) is tussen mannelijke en vrouwelijke dieren. Het lijkt de DEC beter om in experiment 1 eerst in een pilot te onderzoeken of en zo ja welk verschil er is in de reactie van weefsels van mannelijke en vrouwelijke dieren alvorens experimenten 1 en 2 uit te voeren. Waarom doet men deze pilot niet? Zeker omdat experiment 3 na afloop van experimenten 1 en 2 is gepland (althans die indruk ontstaat er).
- 5/Er is sprake van 'naar schatting' 25-30 te testen potentieel toxische stoffen. Bij de berekening gaat men uit van 30 stoffen; is dit een maximum, en zo ja waar hangt het uiteindelijke aantal dan vanaf? Verder schat men 100 extra dieren nodig te hebben voor het beschikbaar hebben van voldoende slices van nier, long en darmen. Gezien de ervaring van de groep lijkt het de DEC dat deze schatting wel omgezet kan worden naar een zeker aantal.
- 6/ Voor experiment 3 worden ongeveer 5 potentieel toxische stoffen vergeleken: waarom ongeveer, waar hangt het exacte aantal vanaf?
- 7/ De onderbouwing van het aantal muizen en andere proefdieren in experiment 3 wordt gegeven op basis van de grootte van de lever van deze proefdieren. Kwantitatieve informatie en/of literatuurreferenties ontbreken voor deze stelling.
- 8/ Omdat de organen van de konijnen, honden en minipigs voor dit experiment van andere experimenten elders in Nederland afkomstig zijn, kunnen ze naar mening van de DEC worden weggelaten uit deze aanvraag. Tenzij de aanvrager de optie open wil houden om bij onvoldoende aanbod van deze dieren zelf tot aanschaf en gebruik van konijnen, honden en minipigs over te willen gaan. Dit moet dan in de strategie veel duidelijker worden beschreven, met duidelijke go no go momenten. Maken konijnen, minipigs en honden echt deel uit van de aanvraag?

- Ten aanzien van het gebruik van honden: zijn er geen alternatieven hiervoor? Waarom zouden er bijvoorbeeld geen -in het wild gevangen - vossen gebruikt kunnen worden?
- Ten aanzien van bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvrager eventuele alternatieven beter naar voren kan brengen.

-
- 9/ Pijn: gesteld wordt dat er geen pijn kan optreden bij de dieren. Dat lijkt vreemd als men wel narcose gaat toepassen. Dus pijn is wel voorzien.
-
- **Vragen/opmerkingen t.a.v. de NTS:**
- 10/ De titel verschilt van die van de Projectbeschrijving. Ook volstaat deze met het noemen van chemicaliën i.t.t. de projectbeschrijving waar het gaat over 'geneesmiddelen en andere chemicaliën'.
- 11/ Er wordt geen expliciete melding gemaakt van het optimaliseren van de duur van de orgaan vitaliteit naar 4-5 dagen.
- 12/ De geschatte aantallen dieren kloppen niet met die genoemd in Bijlage 1!
-
- Datum antwoord: **05-02-2017**
- Verstrekt(e) antwoord(en):

- 1/ Projecttitel is aangepast en overgenomen in de NTS
- 2/ Mee eens, ook fundamenteel onderzoek is nu aangekruist.
- 3/Road map is toegevoegd in projectvoorstel
- 4/Het is aannemelijk dat(door bijvoorbeeld verschillen in expressie van bepaalde metaboliserende enzymen) er verschillen zijn in toxiciteit tussen verschillende proefdieren, organen en sekse. Als de mogelijke toxiciteit van een bepaalde lichaamsvreemde stof in kaart gebracht moet worden, bijvoorbeeld om vast te stellen in hoeverre een bepaald proefdier (ex vivo) hetzelfde op een stof reageert als de mens (ex vivo) of om een voorspelling te doen van de toxiciteit in de mens (translationeel onderzoek), dan is het wenselijk om verschillende proefdier species en seksen mee te nemen (zie doelstelling 3). Voor doelstelling 1 ligt dat niet zo duidelijk: het is bv niet heel waarschijnlijk dat darmen van mannelijke ratten andere slice preparatie/incubatieomstandigheden nodig hebben dan darmen van vrouwelijke ratten. Wel is het bv bekend dat darmen gevoeliger zijn voor ischemische stress dan levers. Het is dus wel nodig om de slice preparatie/incubatieomstandigheden per orgaan te optimaliseren, maar waarschijnlijk niet voor sekse. Doelstelling 2 omvat experimenten die als doel hebben om meer begrip te krijgen over het mechanisme van orgaan toxiciteit en over verschillen in toxiciteit tussen organen en hoeverre deze gerelateerd zijn aan functionele/structurele verschillen tussen organen. Deze experimenten hebben dus niet zozeer predictie of translatie van toxiciteit als doel (zoals bij doelstelling 3). Omdat structuur en functie van levers, nieren, darmen en longen niet (veel) verschillen tussen de verschillende seksen/proefdieren, is het minder van belang om deze proeven in verschillende seksen/proefdieren uit te voeren en is er dus voor gekozen om deze experimenten met mannelijke ratten uit te voeren, tenzij een specifiek onderzoeksdoel om vrouwelijke dieren vraagt. Overigens worden de doelstellingen niet per se in chronologische volgorde afgewerkt: de leverexperimenten en de kortdurende experimenten met andere organen voor doelstelling 2 en 3 kunnen gelijktijdig lopen met de optimalisatie experimenten voor doelstelling 1. De toegevoegde road-map in het projectvoorstel moet dit verduidelijken.
- We vertrouwen erop dat deze toelichting de keuze voor het meenemen van verschillende seksen bij doelstelling 3, maar niet bij doelstelling 1 of 2 verduidelijkt. Op basis van de opmerkingen van de DEC en bovenstaande discussie hebben we besloten dat het beter is om sowieso alle 5 stoffen binnen doelstelling 3 uit te voeren met zowel vrouwelijke als mannelijke dieren, daarom worden er 50 extra (vrouwelijke) ratten aangevraagd.
- 5/Slices worden in ons laboratorium ingezet als "tool" binnen tal van sub projecten (elk overigens met doelstellingen die vallen onder de in het project beschreven hoofd- en subdoelstellingen). In de projectaanvraag wordt een schatting gemaakt van het aantal te verwachten te onderzoeken stoffen. Het precieze aantal hangt af van het aantal interne en externe (andere laboratoria,

bedrijven) aanvragen voor een onderzoek met slices en van de maximale capaciteit van ons laboratorium. In de herziene aanvraag hebben we nu met 30 stoffen gerekend, zodat het uit te voeren aantal experimenten dicht bij de maximale capaciteit van het onderzoekslab ligt. Het valt dus te voorzien dat uiteindelijk minder proefdieren nodig zijn dan aangevraagd zijn.

- 6/ Zie antwoord op vraag 5. Ook hier gaan we uit van de maximale capaciteit en rekenen we in de herziene aanvraag met 5 stoffen.
- 7/ Ons laboratorium heeft veel ervaring met het maken van orgaanslices van verschillende organen en verschillende diersoorten. Uit ervaring weten we, dat we met de huidige stand van de techniek ongeveer 150 kwalitatief goede slices uit een rattenlever kunnen halen, 80 uit een rattennier, 80 uit een muizenlever enzovoort. Dit staat beschreven in bijlage 1, sub 2A (experimentele aanpak). Voor konijnen en andere grotere dieren is niet meer de grootte van de organen bepalend, maar het maximale aantal slices dat binnen één experiment redelijkerwijs te verwerken valt zonder aanzienlijk verlies van de kwaliteit van de slices door een te lange duur van de slice preparatie. Vanuit onze ervaring kunnen we stellen dat het mogelijk is om 300-400 slices te verwerken binnen 1 experiment. Daarom kunnen er bij konijnen 2 stoffen per lever worden bestudeerd.
- 8/ Over het algemeen zullen andere proefdieren dan muis en rat alleen gebruikt worden als het nodig is om een specifieke vraagstelling te beantwoorden over deze species en voor species vergelijking van toxiciteit (doelstelling 3). Konijnen zullen worden aangeschaft mocht het niet mogelijk zijn om organen van elders te betrekken. Omdat we in het verleden ervaren hebben dat orgaan materiaal van honden en minipigs goed te verkrijgen is via lopende contacten hebben we besloten om deze proefdieren uit de aanvraag weg te laten (verwijderd uit bijlage 1).

Ten aanzien van alternatieven

- Het is bekend dat weefsel afkomstig van "non-heart beating" donors door ischemische processen snel aan kwaliteit verliest, wat consequenties kan hebben voor de vitaliteit van de weefselslices. Zelfs hersendood veroorzaakt veranderingen in de fysiologie wat kan leiden tot achteruitgang in de kwaliteit van weefsel (D. W. McKeown et al, Br J Anaesth (2012) 108 (suppl_1): i96-i107). Dit is één van de belangrijkste redenen om niet over te gaan tot gebruik van slachthuis materiaal of organen van wild geschoten dieren. Zoals in ons projectvoorstel te lezen is, zijn de proefdieren die wij gebruiken als "orgaan donor" nog in leven op het moment dat de organen worden uitgenomen. Een andere belangrijke reden om terughoudend te zijn met slachthuis/wild geschoten materiaal is dat de genoemde diersoorten (varken en vos) geen deel uitmaken van het standaard arsenaal proefdieren en dat er dus weinig over bekend is in de literatuur. Overigens is bij wild geschoten dieren standaardisatie vrijwel onmogelijk.
- Hoewel de herziene aanvraag geen honden en minipigs omvat, is bovenstaande verantwoording voor het gebruik van laboratorium dieren in plaats van slachthuismateriaal opgenomen in bijlage 1, onder D.
-
- 9/Dat klopt, daarom is nu in bijlage 1 onder "H" "ja" aangekruist en de volgende uitleg toegevoegd: "Pijn wordt voorzien bij de excisie van de organen, daarom wordt narcose toegepast. Gezien de aard en duur van de ingreep is de anesthesie voldoende om pijn bij het uitnemen van organen te voorkomen".
- 10/ Projecttitel is aangepast en overgenomen in de NTS
-
- 11/ Is aangepast in NTS
- 12/ Is nu aangepast
- **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)? Indien van toepassing, licht toe waarom het project niet vergunningplichtig is en of daar discussie over geweest is. **Ja**
Indien niet vergunningplichtig, ga verder met onderdeel E. Advies.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag / een wijziging op een bestaande vergunning. **Nieuwe aanvraag**
3. Is de DEC competent om hierover te adviseren? **Ja**
4. Geef aan of DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, zijn uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies. Indien van toepassing, licht toe waarom. **N.v.t.**

C. Beoordeling (inhoud)

1. Beoordeel of de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft (*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 Wet Natuurbescherming).

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 de ontwikkelde techniek van precies-gesneden weefselplakjes verder te optimaliseren, de blootstelling, acute en subchronische toxiciteit en mechanismes van verschillende potentieel schadelijke stoffen in verschillende organen te bepalen en de verschillen tussen proefdierspecies en de mens met betrekking tot toxiciteit en blootstelling van geneesmiddelen en andere chemische stoffen in kaart te brengen, alsmede het verschil tussen mannelijke en vrouwelijke proefdieren en het mechanisme achter deze verschillen te onderzoeken. Het uiteindelijke doel is om door middel van het gebruik van PCTS een betere voorspelling van blootstelling en toxiciteit van chemische stoffen voor de mens mogelijk te maken en tegelijkertijd het proefdiergebruik hiervoor te reduceren, het dierenleed te verminderen en uiteindelijk het gebruik van proefdieren zoveel mogelijk te vervangen. Er is geen directe en reële relatie tussen het directe en uiteindelijke doel. 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 zijn de proefdieren, en mensen.

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. Anderzijds zouden de opbrengsten van dit onderzoek in de toekomst minder proefdiergebruik kunnen opleveren.

Waarden die voor mensen: het onderzoek verschaft meer inzicht in mechanismen van - voor de mens- toxische stoffen en aanknopingspunten om dit te vermijden.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?

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 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 huisvesting en verzorging volgens de richtlijn gebeurt. Dit op basis van de daartoe strekkende verklaring van zowel de vertegenwoordiger van de vergunninghouder als de aanvrager onder respectievelijk punt 6 van de ondertekening van de aanvraag en punt F van de bijlage.**

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C2*). **Dit is goed ingeschat. 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 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 in deze aanvraag niet opportuun omdat alle dieren onder narcose gebracht worden en tijdens narcose getermineerd.**

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 voorgestelde experimenten zijn ook bedoeld als –op termijn- alternatief voor *in vivo* experimenten.**

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**

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 wordt voor doelstelling 1 en 2, mannelijke dieren gebruikt en voor doelstelling 3 beide geslachten. 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. Dieren worden gedood om organen te kunnen uitnemen**
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 '**Het voorspellen van de blootstelling aan, en de metabolisme en toxiciteit van geneesmiddelen en andere chemicaliën in proefdieren en de mens door middel van precies-gesneden plakjes weefsel**', dat zich richt op de optimalisatie van de PCTS ex vivo techniek en het gebruik ervan om de toxiciteit van geneesmiddelen en andere chemicaliën te onderzoeken en het mechanisme ervan vast te stellen, het terminaal ongerief dat de proefdieren wordt aangedaan in het onderhavige project?

Waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: **terminaal ongerief**.
Waarden die voor de doelgroep bevorderd worden: **potentieel groot voordeel**.
Algemeen: **vergroting van onze kennis betreffende de toxiciteit van geneesmiddelen en andere chemicaliën voor de mens is van zeer groot maatschappelijk belang, met name voor de gezondheidszorg**.

De DEC-RuG is van mening dat de belangen van de samenleving zwaarder wegen dan de belangen/waarden van de proefdieren waarmee dit onderzoek wordt uitgevoerd in het project '**Het voorspellen van de blootstelling aan, en de metabolisme en toxiciteit van geneesmiddelen en andere chemicaliën in proefdieren en de mens door middel van precies-gesneden plakjes weefsel**'.

De betrokken proefdieren zullen in dit project terminaal ongerief ondervinden. Zij worden in hun welzijn geschaad en hun integriteit zal worden aangetast aangezien zij vanwege de aard van het experiment worden opgeofferd.

Indien de doelstellingen bereikt worden, zal dit project leiden tot een betekenisvolle uitbreiding van de kennis over het gebruik van ex vivo technieken, in bijzonder het PCTS model, voor het inschatten van de toxiciteit van geneesmiddelen en andere chemicaliën, en kunnen resulteren in een terugdringen van het aantal te gebruiken proefdieren in toxiciteitstesten.

Een beter begrip van dergelijke mechanismen is van groot maatschappelijk en economisch belang.

Vandaar dat de DEC-RuG het onderhavige onderzoek, zowel vanuit wetenschappelijk als vanuit maatschappelijk oogpunt, van substantieel belang acht.

Het is zeer aannemelijk dat de doelstellingen behaald zullen worden.

De onderzoekers zullen zoveel mogelijk trachten het aantal te gebruiken dieren tot een minimum te beperken

De DEC-RuG beantwoordt de centrale morele vraag: Rechtvaardigt de doelstelling van het project **Het voorspellen van de blootstelling aan, en de metabolisme en toxiciteit van geneesmiddelen en andere chemicaliën in proefdieren en de mens door middel van precies-gesneden plakjes weefsel**, - dat zich richt op de optimalisatie van de PCTS ex vivo techniek en het gebruik ervan om de toxiciteit van geneesmiddelen en andere chemicaliën te onderzoeken en het mechanisme ervan vast te stellen- de opoffering van 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 ondergane 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 hebben in voorgaand onderzoekprogramma's aangetoond te 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 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 het voorgestelde project '**Het voorspellen van de blootstelling aan, en de metabolisme en toxiciteit van geneesmiddelen en andere chemicaliën in proefdieren en de mens door middel van precies-gesneden plakjes weefsel**', 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 kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificeer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*).

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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
AVD105002017884

Datum 1 maart 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 24 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Precies-gesneden plakjes weefsel als alternatieve methode om blootstelling, metabolisme en toxiciteit van geneesmiddelen en andere chemicaliën te onderzoeken in proefdieren en de mens" met aanvraagnummer AVD105002017884. 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:

Ondertekening

Uw aanvraag is niet door de juiste persoon ondertekend. De ondertekening moet door de portefeuillehouder of diens gemachtigde gedaan worden. Wij verzoeken u bijgevoegd aanvraagformulier te voorzien van de juiste handtekening en aan ons terug te sturen.

Onduidelijkheden

Voor doelstelling 1 en 2 geeft u aan enkel mannelijke ratten te willen gebruiken. Daarnaast geeft u aan dat er geen verschillen verwacht worden tussen mannelijke en vrouwelijke dieren. Kunt u onderbouwen waarom het vanuit wetenschappelijk oogpunt noodzakelijk is om enkel mannelijke ratten te gebruiken? Om het aantal in voorraad gedode dieren te verminderen, kan de CCD als voorwaarde stellen dat in het project dieren van beide geslachten in evenredige hoeveelheden gebruikt moeten worden. Wellicht is het mogelijk voor doelstelling 1 en 2 gebruik te maken van surplusdieren. Indien u

surplusdieren gebruikt voor deze doelstellingen, is het gebruik van één geslacht geen probleem.

Datum:
1 maart 2017
Aanvraagnummer:
AVD105002017884

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:

- Aanvraagformulier
- Melding bijlagen



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: Rijksuniversiteit Groningen

Adres:

Postcode en plaats:

Aanvraagnummer: AVD105002017884

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:

1 maart 2017

Aanvraagnummer:

AVD105002017884

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

Betreft: aanvullende informatie keuze mannelijke proefdieren aanvraag AVD105002017884

Groningen, 13 maart 2017

Geachte CCD leden,

In uw schrijven van 1 maart 2017 geeft u aan dat aanvullende informatie gewenst is ten aanzien van de keuze voor mannelijke proefdieren in onze aanvraag.

Hoewel wij de argumentatie van het CCD omtrent het terugdringen van het doden van proefdieren in voorraad onderschrijven, hebben wij toch besloten om de aanvraag voor mannelijke dieren voor doelstelling 1 en 2 in ons project ongewijzigd te laten.

Het belangrijkste argument hiervoor is dat het bekend is dat geneesmiddelen metabolisme sterk beïnvloed wordt door de expressie van de enzymen die bij dit metabolisme betrokken zijn, en dat de expressie van deze enzymen kwantitatief verschilt tussen de verschillende seksen (vooral in ratten en muizen, zie o.a. Waxman and Holloway, Mol Pharmacol. 2009; 76(2): 215-228). Omdat de toxiciteit van geneesmiddelen afhangt van toxicificatie en detoxificatie door deze enzymen, is het wel degelijk te verwachten dat er (kwantitatieve) verschillen zijn tussen mannelijke en vrouwelijke proefdieren als het gaat om de toxiciteit van geneesmiddelen.

Als de mogelijke toxiciteit van een bepaalde lichaamsvreemde stof in kaart gebracht moet worden, bijvoorbeeld om vast te stellen in hoeverre een bepaald proefdier hetzelfde op een geneesmiddel reageert als de mens of om een voorspelling te doen van de toxiciteit in de mens (translationeel onderzoek), is het daarom wenselijk om verschillende proefdier species en seksen mee te nemen (zie doelstelling 3). In het projectvoorstel hebben we aangegeven dat voor doelstelling 1 en 2 er geen noodzaak is om beide seksen te gebruiken. Onze argumentatie hierbij voor doelstelling 1, is dat het niet te verwachten is dat het effect van de interventie op de verbetering van de kwaliteit van slices afhankelijk is van de sekse die gebruikt is (zie ook brief naar de DEC, februari 2017). Daarom is het niet noodzakelijk om het effect van de interventie te testen op beide seksen. De CCD argumenteert dat als er geen verschillen te verwachten zijn, beide seksen dan ook gemengd/door elkaar (in gelijke verhoudingen) kunnen worden gebruikt. Deze argumentatie delen wij niet: hoewel het effect van de interventie niet anders zal zijn als er mannelijke of vrouwelijke dieren gebruikt worden, zal vanwege boven beschreven verschillen in het metabolisme de variatie in de uitleesparameters die wij gebruiken om het effect van die interventie te meten (o.a. functionaliteit van metabolisme van model geneesmiddelen) wel degelijk groter zijn als mannelijke en vrouwelijke dieren gemengd worden gebruikt. Er zullen in dat geval dus meer dieren nodig zijn om een gunstig effect van interventie aan te tonen. Voor doelstelling 2 geldt hetzelfde: het mechanisme van (verschillen in orgaan-) toxiciteit zal voor de meeste geneesmiddelen niet veel verschillen tussen mannelijke en vrouwelijke dieren, maar het is wel te verwachten dat er kwantitatieve verschillen zijn (bijvoorbeeld in de hoeveelheid geneesmiddel die nodig is om een bepaald effect te bewerkstelligen). Ook voor deze doelstelling val het dus te verwachten dat meer proeven nodig zijn om een mechanisme aan te tonen, omdat er variatie geïntroduceerd wordt als mannelijke en vrouwelijke proefdieren door elkaar gebruikt worden.

Wij stellen dus, dat we meer proefdieren zouden moeten aanvragen als mannelijke en vrouwelijke dieren gemengd worden gebruikt. Dit zou leiden tot meer werk (meer proeven)

en meer kosten, zonder het totaal aantal gedode dieren fors te reduceren. Om deze reden hebben we besloten de aanvraag ongewijzigd te laten. We hopen dat u deze argumentatie onderschrijft.

In afwachting,





> 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
AVD105002017884
Bijlagen
1

Datum 11 april 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 24 februari 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Precies-gesneden plakjes weefsel als alternatieve methode om blootstelling, metabolisme en toxiciteit van geneesmiddelen en andere chemicaliën te onderzoeken in proefdieren en de mens" met aanvraagnummer AVD105002017884. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 16 maart 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof de keuze voor één of beide geslachten.

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.

Om het aantal surplusdieren terug te dringen, moet u zo veel als mogelijk gebruik maken van surplusdieren.

U kunt met uw project "Precies-gesneden plakjes weefsel als alternatieve methode om blootstelling, metabolisme en toxiciteit van geneesmiddelen en andere chemicaliën te onderzoeken in proefdieren en de mens" starten. De vergunning wordt afgegeven van 11 april 2017 tot en met 1 maart 2022.

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 24 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: 


Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
11 april 2017
Aanvraagnummer:
AVD105002017884



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 11 april 2017 tot en met 1 maart 2022, voor het project "Precies-gesneden plakjes weefsel als alternatieve methode om blootstelling, metabolisme en toxiciteit van geneesmiddelen en andere chemicaliën te onderzoeken in proefdieren en de mens" met aanvraagnummer AVD105002017884, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies. Er worden aanvullende voorwaarde(n) gesteld. De CCD is van mening dat voor dit project er gebruik gemaakt moet worden van surplusdieren.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 24 februari 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 24 februari 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 24 februari 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 24 februari 2017, ontvangen op 24 februari 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 16 maart 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Het verzamelen van organen uit verschillende diersoorten voor ex vivo toxiciteitsstudies				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	450	Terminal	
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	200	Terminal	
	Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) /	50	Terminal	

Aanvraagnummer:

AVD105002017884

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.

Er wordt zoveel mogelijk gebruik gemaakt van surplusdieren. Alleen als het niet mogelijk is de doelstellingen van het project te halen binnen de duur van de vergunning, kunnen na afstemming met de IvD andere dieren ingezet worden.



Aanvraagnummer:

AVD105002017884

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:

AVD105002017884

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.