

Inventaris Wob-verzoek W17-12										
nr.	document NTS 20171630	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x		x	x		
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	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x		x	x		
8	DEC-advies				x		x	x		
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
10	Verzoek om aanvullende informatie 1				x		x	x		
11	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
12	Verzoek en reactie aanvullende informatie 2				x		x	x		
13	Adviesnota CCD		x							x
14	Beschikking en vergunning				x		x	x		



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven *Administratieve gegevens*

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in [redacted] <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 [redacted] Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [redacted] KvK-nummer [redacted] Straat en huisnummer [redacted] [redacted] Postbus [redacted] Postcode en plaats [redacted]
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	IBAN [redacted] Tenaamstelling van het rekeningnummer [redacted]
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters [redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. Functie [redacted] Afdeling [redacted] Telefoonnummer [redacted] E-mailadres [redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters [redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. Functie [redacted] Afdeling [redacted] Telefoonnummer [redacted] E-mailadres [redacted]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 9 - 2017
- Einddatum 1 - 9 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Development of new ruminant vaccines
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Ontwikkeling en registratie van nieuwe vaccins tegen ziekten bij herkauwers
- 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 € 1.684 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
- DEC advies
 x Factuureinformatie

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 ondertekende 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 2 - 5 - 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.

Rationale

Ruminants represent around 32% of the global animal health market, with vaccines being a key segment in the ruminant health market. This market is extremely diverse: The most important species of farmed ruminants are cattle, sheep and goat, but in certain regions, also buffalo, deer, and camels are raised in

an agricultural setting. The husbandry and management systems vary between species to a large extent also on whether the animals are kept for meat, milk or wool production. By consequence, a broad portfolio of ruminant vaccines is required to fulfil the specific needs for the different markets.

One aspect is however constant across the whole ruminant health market: the trend for increasing animal productivity and growing farm/herd size, which is worsening the impact of infectious diseases. Vaccination is widely applied to control infectious diseases, leading to a reduction in the amount of antibiotics used and increased animal welfare.

The company is constantly striving to strengthen its portfolio of ruminant vaccines by improving existing vaccines or developing new ones. New fields of vaccine research may include infectious agents that are by themselves harmless for ruminants, but animals are vaccinated to reduce the risk of infection for humans for example in case of [REDACTED] diseases or other zoonoses. [REDACTED] or other targets that are not infectious agents are out of scope for this application.

Each pathogen has its own specific mechanism of pathogenesis and protection through vaccination requires specific immune responses, either humoral, cellular immunity, or a combination thereof. For this reason, new vaccines are to a large extent "tailor-made". Where possible, knowledge acquired with other pathogens / vaccines is used to design candidate vaccines in order to increase the likelihood of success and thereby minimize the numbers of animals needed during the whole development process of a new vaccine. Vaccines can be either (components of) inactivated pathogenic microorganisms or viruses, live attenuated microorganisms or viruses, or [REDACTED]

Most inactivated vaccines are formulated together with an adjuvant and primarily induce a humoral response, while live vaccines typically induce both a humoral and cellular response. The attenuation of live vaccines can be accomplished by classical means (e.g. in vitro passaging or chemical mutagenesis) or by recombinant methods (GMO vaccines).

In general, vaccines are given to animals that should themselves be protected against a certain agent, but in case of diseases that affect very young animals, the mother is vaccinated in order to protect its offspring by the transfer of specific antibodies via the colostrum and milk or specific antibody preparations are added to the milk.

The two key requirements for any vaccine are (i) safety and (ii) efficacy. As vaccination is a medical treatment administered to healthy individuals, it is important that the vaccine does not cause undesired (negative) effects other than some transient minor discomfort. With regard to efficacy, the benefit in providing protection from disease and/or infection has to be demonstrated to justify the use. According to the applicable regulations in Europe and the majority of other countries, the safety and efficacy of a vaccine candidate has to be demonstrated in animal experiments. In addition, some quality control tests also require animal testing.

Vaccine research and development

Within a vaccine project two phases can be distinguished: the research phase and the development phase.

The research phase comprises the search for new pathogens, new adjuvants, new vaccine formulations and new [REDACTED] methods as well as expansion of the knowledge on known pathogens and technologies. For example, protective antigens might be identified or methods of attenuation of strains to create live vaccines might be investigated. Candidate vaccines are then tested in pilot studies to determine their efficacy and safety. Based on the outcome of these studies, candidate vaccines with a fixed formulation are selected to enter the development phase.

The animal studies that are performed during the development phase are necessary to prepare the registration dossier that is submitted to the regulatory authorities. The requirements for these studies are laid down in EU directives, the Pharmacopoeia Europaea (Ph.Eur) and guidelines and regulations of the European Medicines Agency and other international regulatory bodies.

Several batches of the new vaccine are produced and full quality control testing is performed in order to meet the requirements of the regulatory authorities by providing safety and efficacy data of these batches.

Once the registration dossier has been submitted, additional studies may be requested by the regulatory authorities during the licensing procedure.

For some vaccines, registration and launch of the product is not necessarily the end of the R&D input.

The development may continue to improve the product characteristics. This can involve the addition of new label claims (e.g. for the compatibility with other products), improvements to production processes and/or associated quality control methodologies, inclusion of additional antigens or other changes in vaccine formulation or novel application routes. If the marketing authorisation for a vaccine should be expanded to other markets with different licensing regulations, additional testing of the product may be required to fulfil the applicable regulations of the concerned countries.

The current project proposal covers studies that have to be done with the final formulation of a vaccine during the development phase. The research phase is covered by a separate project. Alternatively the development studies are performed with a final vaccine formulation that was obtained from a research organization or acquired from a different company. For the majority of development studies, the design as well as the procedures applied are determined by the type of study (safety, efficacy study). In some cases, the nature of the disease also determines how a study has to be performed. Below, some back-ground information is given about infectious diseases in ruminants that are in scope for this project.

Diseases within the ruminant vaccine development project

This vaccine development project targets diseases that have a major impact on the ruminant industry (animal welfare, production losses, treatment costs) and / or Human Health concerns (zoonotic disease and reduction in the amount of antibiotics used). Typically, only diseases with a high incidence in the (European) cattle population or exotic diseases for which the distribution within the cattle population should be prevented are in scope. Diseases with a lower incidence but causing severe disease in animals and / or humans may also be considered.

Currently, the main target species for ruminant vaccines are cattle, yet several cattle pathogens also affect sheep and goat. In these cases, testing in small ruminants might also be necessary, especially in case of zoonoses or animal pathogens that are subject of control programs. Moreover, small ruminants might serve as model for infection studies.

The following infectious diseases are targeted within the Ruminant vaccine development project at the company.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block 1]

[Redacted text block 2]

[Redacted text block 3]

[Redacted text block 4]

[Redacted text block 5]

[Redacted text block 6]

[Redacted text block 7]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[Redacted text block containing multiple paragraphs and a bulleted list of items.]

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 goal of the project is to generate the data (efficacy, safety and potency) to be included in marketing authorization applications (registration dossiers) for new or updated vaccines for ruminants. The new vaccines will have already shown proof of concept (i.e. induction of protection combined with an acceptable safety profile) in the research phase of vaccine development, and the studies to be undertaken are needed to fulfil the regulatory requirement in and outside the EU. To be able to make changes to active ingredients and/or have additional efficacy claims, current registration dossiers may have to be updated by inclusion of new efficacy and/or safety studies. The outcome of the project is the licensing of new vaccines that fulfil unmet needs in the field of ruminant industry or updated licenses for existing vaccines.

3.3 Relevance

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

Vaccines are the most effective method for prevention or eradication of diseases. Further improvement and extension of the available vaccine range will bring safer, more efficacious vaccines, including vaccines against emerging diseases. Also, combinations of diseases can be encountered more effectively, with fewer vaccination moments (injections), when vaccines are developed that can be used at the same time or mixed with other vaccines, or even in ready to use combination products.

The prospects are that the new vaccines will further reduce animal suffering and the use of antibiotics, and will lead to reduced losses in meat and milk production and thereby to a more sustainable use of natural resources.

3.4 Research strategy

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

Due to the complexity of vaccination-challenge studies in ruminants, only the most promising vaccine candidates for which the safety and efficacy data obtained during the research phase indicate a high probability of success are approved for further development. [REDACTED]

At the start of the development phase of a new vaccine, it is decided in which area(s) of the world the product is intended to be licensed as that determines in detail which types of studies have to be performed to satisfy local regulatory requirements. In general, the types of studies are similar in all countries, but specific requirement may exist with regard to the numbers of animals to be used, efficacy criteria to be evaluated or the set-up of studies (e.g. inclusion of a double-dose group in safety studies with inactivated vaccines for a number of countries outside the EU). At that time, also the minimum vaccination age, the vaccination schedule and the intended label claims are set. Registration dossiers need to contain a comprehensive set of efficacy and safety studies in the target animal to allow regulatory bodies to make a sound risk-benefit analysis that is the basis for their decision on the marketing approval of a new product. Therefore, all studies have to be performed with the formulation to be marketed and all production and quality controls methods should be finalized before start of the studies. In addition, results of laboratory safety and efficacy studies will have to be provided to authorities in order to be able to obtain a permit for the field studies (which are outside the scope of this project) that are to be included in the dossier. During the evaluation of the registration dossier, additional animal studies may be requested by the regulatory authorities.

Similarly, when updating the characteristics of a licensed vaccine, e.g. for showing compatibility with another product or protection against a new serotype of the pathogen, the number of studies required depends on the regulations and guidelines for registration variation procedures.

It is expected that [REDACTED] will be investigated within this project.

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.

During the development phase, the following types of animal experiments will be undertaken (described in detail in appendices 1 through 4).

Ad 1) Safety studies in ruminants

The safety of a new vaccine will be evaluated in the target species according to Ph.Eur 5.2.6 (Evaluation of safety of veterinary vaccines and immunosera) or vaccine-specific monographs, EU Directive

2009/9/EC amending Directive 2001/82/EC (Community code relating to veterinary medicinal products) and national guidelines and regulations outside the EU. This generally means observation for abnormal systemic (clinical signs, body temperature etc.) and local (injection site) reactions after administration. For vaccines that are intended to be given to pregnant and or lactating animals, also the effect on reproductive performance and milk yield, respectively will be investigated. In addition to these parameters, live vaccines will have to be evaluated for persistence and dissemination in vaccinated animals and their ability to spread to unvaccinated sentinel animals. Live vaccines will also be tested for reversion to virulence, i.e. re-isolation of the vaccine from vaccinated animals followed by administration back into other animals up to five times in total.

These safety studies will all be performed according to the following basic set-up:

- Administration of the vaccine
- Observation of systemic and local reactions post vaccination
- Monitoring of persistence and excretion of the vaccine by sampling of blood, excretions and mucosal swabs (live vaccine only)
- Necropsy to investigate (histo)pathological changes at the injection site and re-isolation of the vaccine (live vaccine only)

The degree of discomfort encountered directly as a result of vaccination and sampling is small and such procedures are routinely used in normal veterinary care. A moderate degree of discomfort may occur in case of repeated sampling.

Ad 2) Safety studies in non-target animals

For live vaccines that are derived from a pathogen with a broad host range and/or zoonotic potential, and for live vaccines that are obtained by genetic modification it is necessary to investigate the safety for non-target species that may come into contact with the vaccine according to Ph.Eur 5.2.6 (Evaluation of safety of veterinary vaccines and immunosera), EU Directive 2009/9/EC amending Directive 2001/82/EC (Community code relating to veterinary medicinal products) and national guidelines and regulations outside the EU. This means observation for clinical signs after administration, persistence and shedding.

Studies will be performed according to the following basic set-up:

- Administration of the vaccine
- Observation of systemic and local reactions post vaccination
- Monitoring of persistence and excretion of the vaccine by sampling of blood, excretions and mucosal swabs
- Necropsy to investigate (histo)pathological changes and re-isolation of the vaccine

The degree of discomfort encountered directly as a result of vaccination and sampling is small and such procedures are routinely used in normal veterinary care. A moderate degree of suffering may occur in case of repeated sampling.

Ad 3) Efficacy studies in ruminants

The efficacy of vaccines (of the final product/formulation) has to be shown under controlled laboratory conditions as described in Ph.Eur 5.2.7 (Evaluation of efficacy of veterinary vaccines and immunosera) or vaccine specific monographs, EU Directive 2009/9/EC amending Directive 2001/82/EC (Community code relating to veterinary medicinal products) and national guidelines and regulations outside the EU. For all efficacy claims (e.g. protection against infection, reduction of clinical signs, reduction of shedding) to be made for a new or updated product, proof should be provided by showing a meaningful and statistical significant difference between vaccinated animals and unvaccinated controls in an infection model (vaccination-challenge studies). Also, claims regarding onset and duration of immunity have to be substantiated by vaccination-challenge studies. Infection models may be described in vaccine-specific Ph.Eur monographs or may have been developed during the research phase of vaccine development. In those instances where a surrogate (e.g. serological) marker for protection has been established, (part of) the vaccination-challenge studies may be replaced by studies that only measure the immunological response after vaccination.

Studies will be performed according to the following basic set-up (infection will not be performed if an immunological marker for protection is available):

- Administration of the vaccine
- Monitoring responses (e.g. blood sampling and sampling to measure shedding of the vaccine strain)
- Infection with a pathogen [REDACTED]

[REDACTED]

- Observation of clinical signs post infection/sampling (e.g. for shedding of the pathogen)
- Necropsy to investigate (histo)pathological changes

The degree of discomfort encountered directly as a result of vaccination and sampling is small and such procedures are routinely used in normal veterinary care. A moderate degree of suffering may occur in case of repeated sampling. A moderate or in a very low number of studies a severe degree of suffering may occur after the onset of clinical disease following infection, but at a lower level in the vaccinated animals than in the unvaccinated controls.

Ad 4) Potency testing of vaccine batches

In vivo potency tests have to be performed on certain inactivated vaccines to determine the efficacy (potency) immediately after production and to monitor the stability after storage. In such a batch potency test, model animals [REDACTED] are vaccinated and the potency is determined either by measuring the immune response (e.g. antibody titers) or as protection against challenge infection. The latter is only done if no immunological marker for protection is available or if required by the applicable legislation (Ph. Eur monograph).

The *in vivo* potency tests will be performed according to the following basic set-up:

- Administration of the vaccine
- Monitoring responses (e.g. blood sampling)

(If an immunological marker for protection is not available):

- Infection with a pathogen
- Observation of clinical signs post infection/sampling (e.g. for shedding of the pathogen)
- Necropsy to investigate (histo)pathological changes

The degree of discomfort encountered directly as a result of vaccination and sampling is small and such procedures are routinely used in normal veterinary care. A moderate degree of suffering may occur in case of repeated sampling. A moderate to severe degree of suffering may occur after the onset of clinical disease following infection, but at a lower level in the vaccinated animals than in the unvaccinated controls.

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.

At the company, all R&D projects are subject to regular review by the R&D Governance Body. **If the company markets already a vaccine against the specific disease, an evaluation will be made, whether that vaccine can be updated, which in most cases is the preferred situation because less (animal) studies are required, or a new vaccine candidate needs to be further developed. Only vaccine candidates for which the safety and efficacy data obtained during the research phase indicate a high probability of success are approved for further development.**

At the start of a development project, the project team agrees on the types of studies required and the sequence of these studies.

Typically, the vaccine dose, route and schedule is first determined in an efficacy study in naïve animals, free of antibodies against the respective antigen. In this basic efficacy studies, the challenge infection is mostly done 3-4 weeks after the vaccination. If a vaccine is intended for use in young animals, the dose is then confirmed in animals with maternal antibodies. In a later stage of the project, the efficacy is tested for a longer interval between vaccination and challenge to demonstrate the duration of immunity. In case of live vaccines, it may also be required to perform studies with a shorter interval between vaccination and challenge to determine the onset of immunity.

The safety of the vaccine is investigated in parallel, but in separate studies, as the dose levels to be tested are different from the levels in the efficacy studies. In case of a live vaccine, the following safety characteristics have to be investigated: i) dissemination of the strain in the vaccinated animal, ii) shedding of the strain, iii) the potential to spread to in-contact animals and iv) the potential to revert to virulence by animal-to-animal passage.

Once these criteria are met, the safety of the final product composition (including any excipients such as freeze-dry stabilizers and adjuvant) has to be demonstrated in animals of the most susceptible categories: animals of the youngest age group intended for vaccination. If a vaccine should be used during pregnancy and / or lactation, the safety has also to be demonstrated in these categories.

All above mentioned studies done to obtain regulatory approval for ruminant vaccines are mandatory.

During the regular (1-2 times per year) project reviews by the R&D Governance Body the outcome of the studies is assessed against the requirements and pre-set milestones as well as go/no-go decision points are evaluated.

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	Safety studies in ruminants
2	Safety studies in non-target animals
3	Efficacy studies in ruminants
4	Potency testing of vaccine batches
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

██████████

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	Development: Safety studies in ruminants

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

In assessing the safety of live and inactivated vaccines the following aspects must be studied:

1. The effect on general health; with live vaccines particular attention has to be paid on signs typical of infection with the respective virulent organism. After vaccination with a single dose, an overdose and a repeated dose, one or more of the following parameters will be evaluated:

- Clinical signs (e.g. changes in general health)
- Body temperature (rectal temperature)
- Body weight
- Assessment of injection site reactions
- Post mortem examination (macroscopical and microscopical)

For live vaccines, a number of additional studies is required:

2. Spreading and dissemination of the vaccine strain. Spread from the vaccinated animal is determined by looking for the vaccine organism in secretions and excretions. Consequently, swabs from ██████████ mucosae are taken. Unvaccinated sentinel animals that are also being sampled are placed in contact with vaccinated animals to evaluate animal-to-animal transmission. Also, the dissemination of the vaccine strain in the vaccinated animal, with particular attention being made to the predilection sites for replication and the injection site should be investigated. At different time points after inoculation, animals are sacrificed and tissue- and organ samples are taken and tested for vaccine strain content.

3. Reversion to virulence. To test for reversion to virulence the vaccine should be given by the route most likely to make the vaccine strain revert. It should then be re-isolated from the animal and passaged by administration back into other animals up to five times in total. The safety profile of the passaged material will then be compared with the starting material.

In case a vaccine is intended for use in pregnant animals, additional safety studies are required in this category of animals. Pregnant animals have to be inoculated at different stages of pregnancy. The animals are then observed until the end of pregnancy to determine the outcome of the pregnancy and the health status of the offspring. Samples have to be taken from the offspring to determine the presence of the vaccine strain or specific pre-colostral antibodies. [REDACTED]

Additional safety studies are required for vaccines that are to be used in lactating animals. The dams have to be vaccinated and the milk yield is determined and compared to historical or reference values or to a direct control group.

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

Two or more of the following treatments will be employed in order to fulfil the requirements for the specific studies as laid down in the Ph Eur (*in italics the frequency of the treatments*):

1. Vaccine administration [REDACTED]
2. Blood sampling [REDACTED] to determine [REDACTED] and / or to determine the presence of the vaccine strain in the blood
3. Clinical examination including measurement of rectal temperature [REDACTED]
4. Palpation of the injection site [REDACTED] *to determine the examine local reactions*
5. Weighing [REDACTED]
6. Swabbing of (mucosal) surfaces [REDACTED] to determine the excretion of the vaccine strain
7. Urine, fecal, colostrum / milk samples [REDACTED] to determine the presence of the vaccine strain
8. [REDACTED] to determine the presence of the vaccine strain in the [REDACTED]
9. [REDACTED] to determine the presence of the vaccine strain in the [REDACTED]
10. Pregnancy check [REDACTED]
11. Euthanasia

The duration of all procedures listed above will only be minutes at most. In general, the length of the observation period after vaccination is 14 days after each vaccination, unless specified otherwise in a vaccine-specific Ph.Eur monograph. If pregnant animals have to be followed until birth, the observation period will be longer, but in general, the total number of treatments does not increase. Also, a longer observation period will be needed in case injection site reactions do not resolve within 14 days. A third exception might be studies to follow the potential persistence of a live vaccine strain.

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

In general, the minimal numbers of animals to be used in safety studies with final product are specified in Ph.Eur monographs and in EU and national regulations. However in order to warrant that the required minimal number of animals are available for the evaluation of results at the end of the study, it is often necessary to include a number of additional animals at the start of the study. The number of these "additional" animals depends on the specific requirements for the animals (age, antibody status, pregnancy status) and the likely hood of intercurrent death or intercurrent disease that might lead to exclusion from the study. For each study, a thorough evaluation is made to meet the mandatory requirements on animal number for regulatory studies while using the minimum possible number of animals. Likewise, for each study, an evaluation will be made, whether inclusion of (a) control group(s) is mandatory or necessary for a valid test.

B. The animals

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

Studies will be performed in cattle, sheep and / or goats as appropriate. Animals of both sexes can be

used for this type of animal experiment unless the study has to be performed in pregnant and / or lactating animals.

Purchase of animals: The animals will be purchased from commercial suppliers, obtained from affiliated farms or bred at [REDACTED] facilities.

If a certain microbial status is required, animals will be purchased from farms with the respective (certified) microbiological status and / or screened prior to inclusion in the study.

Special requirements

If young animals with a specific [REDACTED] status are required, it is often necessary to warrant that [REDACTED] [REDACTED]. As these [REDACTED] animals are more susceptible for intercurrent infections, they receive [REDACTED] treatment. With the exception of studies against [REDACTED] pathogens, [REDACTED] can be given to the animals from [REDACTED] onwards as an aid in the prevention of [REDACTED].

Age of animals:

Age of the animals for vaccine development varies from a few hours old to adult. The age of the animals to be used should be the minimal age recommended for use of the vaccine.

If very young lambs or kids have to be vaccinated, it might be necessary to include the ewes / goats to foster the lambs / kids. For vaccines intended to be used for pregnant / lactating animals, it may be necessary to include dams in one or more specific trimester of pregnancy, depending on the vaccination schedule to be recommended. Samples might have to been taken from the offspring, for certain studies, euthanasia of the offspring might be required.

Based on the experience over the past 5 years and the current R&D program and priorities, the total expected number of cattle, sheep and goat, respectively per discomfort category is the following.

Species	Discomfort score*	Animals<6 months	Adult**
Cattle	Mild	[REDACTED]	[REDACTED]
	Moderate	[REDACTED]	[REDACTED]
	Severe	[REDACTED]	[REDACTED]
Sheep	Mild	[REDACTED]	[REDACTED]
	Moderate	[REDACTED]	[REDACTED]
	Severe	[REDACTED]	[REDACTED]
Goat	Mild	[REDACTED]	[REDACTED]
	Moderate	[REDACTED]	[REDACTED]
	Severe	[REDACTED]	[REDACTED]

*: Discomfort due to disease

**:[REDACTED]

***: Due to repeated procedures the overall discomfort will be moderate for at most 30% of the animals [REDACTED]

In safety studies, a vaccinated group is compared to an unvaccinated control group and generally [REDACTED] animals are used per group, but the total number of safety studies that needs to be done for a vaccine is strongly dependent on the target animal category (young animal/adult (breeding) animal), the type of vaccine (inactivated/live) and the country/region that the vaccine is intended for. All vaccines have to be tested in animals of the youngest vaccination age to assess the effect of vaccination on general health. In addition, studies in every trimester of pregnancy and during lactation may be needed if vaccines are intended for adult cows, ewes and goats, depending on the recommended vaccination schedule. In

addition to the standard evaluation of general health, which has to be performed for both live and inactivated vaccines, separate studies are required for live vaccines to determine the spreading and dissemination of the vaccine strain and the potential to revert to virulence. Furthermore, for some countries (e.g. China) special requirements exist with regard to the experimental design of safety studies and additional studies (e.g. overdose safety for inactivated vaccines) have to be undertaken. Taken together, the anticipated number of animals per category of vaccine is the following:

Per Model	Cattle <6Months	Adult catle	Sheep <6Months	Adult sheep	Goat <6Months	Adult goat
██████████	████	█	█	█	█	█
██████████	█	████	█	█	█	█
██████████	████	████	████	████	█	█
██████████	████████	█	████████	█	████	████
██████████	█	████	█	█	█	█
██████████	████	█	█	█	█	█
██████████	█	████	█	█	█	█

*: combination vaccines against more than one type of infection are arbitrarily put into one of the categories

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

Re-use might be considered for animals that experience only minor discomfort during the first study, for example uninfected control animals. This approach is considered acceptable especially in case of animals that were raised under special conditions (e.g. ██████████ to achieve a certain ██████████ status).

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

xNo

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement:

In accordance with international regulations, the safety of a vaccine has to be demonstrated in animals of all or the most sensitive target species and the most sensitive category (e.g. youngest age group or during pregnancy).

Reduction: For most of the safety investigations, the minimal number of animals to be used is specified in general or specific guidelines and all measures will be taken to meet the mandatory requirements of the regulatory authorities.

However in order to warrant that the required minimal number of animals are available for the evaluation of results at the end of the study, it is often necessary to include a number of additional animals at the start of the study. The number of these "additional" animals depends on the specific requirements for the animals (age, antibody status, pregnancy status) and the likely hood of intercurrent death or intercurrent disease that might lead to exclusion from the study. For each study, a thorough evaluation is made to meet the mandatory requirements on animal number for regulatory studies while using the minimum possible number of animals.

In case the numbers of animals to be used are not fixed in regulations, they will be reduced wherever

possible without endangering the scientific integrity of the work. This will be achieved through an ongoing evaluation of the observations in each study. The number of animals per study will be substantiated in each study protocol. According to internal procedures, the study protocol will be reviewed by the Animal Welfare Body and a statistician.

Refinement: International regulations determine to a large extent what sort of data must be generated and this determines which methods have to be employed. Where possible it is pursued to refine the routes of administration of substances and sampling techniques to improve, but without endangering the scientific outcome.

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

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed. Furthermore efforts are made to optimally enrich the environment during containment.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

The vaccines in development are unique and proprietary to [REDACTED]. The safety has to be demonstrated for each vaccine composition.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

The animals are housed socially, but animals might have to be housed (temporarily) individually without physical contact (but in the same holding room) in order to [REDACTED]. Some studies may require limited bedding during containment.

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.

Vaccination, and sampling of blood-are part of normal farm practice/veterinary care and will induce only mild discomfort. If the sampling is repeated (>5), the discomfort is considered to be moderate as a result of the stress during restraining and handling of the animal. All biotechnical procedures such as vaccination and blood sampling procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) (GLP accredited procedures).

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Measurement of body temperatures and body weight, sampling urine, faeces, colostrum/milk, sampling on different mucosae [REDACTED] as well as [REDACTED] and pregnancy check are part of normal farm practice/veterinary care and will induce only mild discomfort. [REDACTED] sampling or [REDACTED] are repeated the discomfort is considered to be moderate. All biotechnical procedures such as vaccination and sampling procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) (GLP accredited procedures).

[REDACTED] animals are more susceptible to disease and might therefore encounter discomfort related to intercurrent diseases. Transport of the animals to the testing facility might cause transient discomfort for the duration of the transport, especially for animals that are transported [REDACTED]

Vaccination can cause a transient increase in rectal temperature, sometimes accompanied with a reduced level of activity, and a transient vaccination site reaction. Systemic reactions generally disappear within 24 hours, but local reactions (that are generally painless) can persist for several days and even weeks. The safety profile of the vaccine compositions used in a development study has typically been determined and found acceptable in the feasibility phase of the project. Therefore, adverse events observed in development studies are in general comparable to those observed after application of commercial vaccines.

The clinical health status of all animals is checked at least once a day by qualified personnel. Special attention is paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

In consultation with the veterinarian and Study Director it will be decided whether to apply adequate veterinary care to alleviate unexpected pain and/or distress (If treatment does not interfere with the test results). In case of severe suffering, humane endpoints are applicable. General humane endpoints are described in an SOP (e.g. the condition of the animal prevents it from eating and drinking regularly, severe loss of body weight) and test specific humane endpoints are given in each study protocol if applicable.

Explain why these effects may emerge.

These procedures may be part of the experimental design. For vaccines intended for use in young animals, the study design may require that animals are vaccinated at the [REDACTED] or when only [REDACTED] [REDACTED] In these cases, the young animals have to be [REDACTED] accordingly from the farm of birth to the testing facility.

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

All biotechnical procedures will only be performed according to standard procedures described in SOPs (GLP accredited procedures).

The number of samplings will be done in accordance with the respective guidelines or if no requirements are given, the number of samplings is reduced to a minimum number required for a valid evaluation of results.

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.

Safety studies will only induce mild discomfort, it is not expected that humane endpoints need to be applied.

General humane endpoints are applicable to all animals, irrespectively of the type of experiment.

General Humane Endpoints:

- The animal experiences more than minor additional discomfort as a consequence of conditions resulting in long term or non-reversible inability to eat and or drink autonomously, fast or long lasting loss of weight, diseases or conditions that cause severe pain, suffering or discomfort such as bone fractions, force unnatural positioning and / or movements, open wounds or abscesses.
- Scientific endpoints: The target of the study reached / all planned samplings have been performed
- (Reliable and useful) results cannot be reached for reasons unrelated to the study

Indicate the likely incidence.

it is not expected that the treatment causes severe discomfort that requires euthanasia, yet discomfort could be caused by intercurrent disease at a maximum of 2%.

K. Classification of severity of procedures

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

Discomfort will be mild to moderate depending on the number of sampling points. See B for an overview of the number of animals that is expected in each discomfort category.

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.

Postmortem investigation can be part of the experimental design to evaluate (histo)pathological lesions, at the injection sites and or to evaluate the effect of the vaccine candidate on different organ systems and or to attempt re-isolation of the inoculum from tissues and organs.

In addition, animals vaccinated with a non-licensed vaccine or infected with a pathogen cannot be returned to the farm of origin or transported to another farm to prevent the spread of disease.

Therefore, all animals might have to be euthanized at the end of the study or when a humane endpoint is reached. Control animals that have not been vaccinated and infected may be reused or returned to the farm of origin or transported to another farm. In case of a surrogate immunological marker (no challenge), animals housed on contract farms can remain on the farm or transported to other farms until the end of their natural/economic life.

Moreover, return of the animals to commercial farms or slaughter for human consumption is often prohibited by the current legislation on use of antibiotics.

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'. [REDACTED]

1.2 Provide the name of the licenced establishment. [REDACTED]

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
2	Development: Safety studies in non-target animals

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

For live vaccines that are derived from a pathogen with a broad host range and/or zoonotic potential, and for live vaccines that are obtained by genetic modification (GMO) it is necessary to investigate the safety for non-target species that may come into contact with the vaccine according to Ph.Eur 5.2.6 (Evaluation of safety of veterinary vaccines and immunosera), EU Directive 2009/9/EC amending Directive 2001/82/EC (Community code relating to veterinary medicinal products) and national guidelines and regulations outside the EU. For live GMO vaccines testing of persistence in non-farm animals such as rodents or birds may also be required to evaluate environmental risks.

Such studies will be limited to application of the vaccine via the oral or respiratory route, followed by observation for clinical abnormalities and investigation of spread and dissemination. Two or more of the following parameters will be evaluated:

- Clinical signs (e.g. changes in general health)
- Body temperature (rectal temperature)
- Virus or bacterial shedding (swabbing of mucosal surfaces, testing of faecal samples or urine)
- Viraemia or bacteraemia, or haematological changes (blood sampling)
- Post-mortem examination

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

Two or more of the following treatments will be employed (in italics the frequency of the treatments):

1. Blood sampling [REDACTED] to determine [REDACTED]
2. Vaccine administration [REDACTED]
3. Measurement of rectal temperature [REDACTED]
4. Weighing [REDACTED]

5. Swabbing of mucosal surfaces [REDACTED] to determine the presence of the vaccine strain
6. Collection of faeces and urine samples [REDACTED] to determine the presence of the vaccine strain
7. Euthanasia

The duration of all procedures described above will only be minutes. The length of the observation period after vaccine administration is in principle [REDACTED] days, unless specified otherwise in a vaccine-specific Ph.Eur monograph, but will be longer in case of a persistent live vaccine strain.

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

The numbers of animals to be used in safety studies are mostly specified in Ph.Eur monographs and specific national regulations, and all measures will be taken to meet the mandatory requirements of the regulatory authorities while using the minimum possible number of animals.

B. The animals

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

Based on the experience over the last 5 years and the current R&D program and priorities, the total expected number of animals required is:

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

* Required for exceptional ruminant pathogens for which dogs are an alternative host, such as [REDACTED]

Rats, chicken, pigs and dogs of both sexes will be used, but for [REDACTED] only females will be included in studies because of a higher risk of fighting in male animals and the relatively long time that the animals are in experiment. With regard to the length of these experiments (1-2 months) it is not acceptable to use males, because they would need to be single housed.

Welfare concerns are the basis for the preferred use of female [REDACTED] because they hardly fight. Data from recently executed experiments with male animals have shown that in half of the experiments there was a loss of animals because of severe fighting. This has resulted in the repetition of these experiments and therefore in the use of more animals. A loss of animals due to fighting has never occurred when female mice were used. We consider the aggression and fighting a worrying impairment of welfare. Moreover, the aggression will cause stress, which is known to have effects on the immune system.

In these studies the functioning of the immune system is crucial and variation in the immune response caused by external factors should be avoided as much as possible.

In addition, using animals of both sexes will increase the variability and thereby increase the number of animals needed.

Origin mouse/rabbit/rat:

All animals are supplied by certified vendors for experimental animals accompanied by a health certificate according to FELASA recommendations. All purchased animals have a SPF status.

Origin chicken:

Own SPF poultry breeding unit or commercial vendor.

Origin dog:

Own SPF breeding unit or commercial vendor.

Origin pigs:

Commercial vendor or affiliated farm.

Age of animals:

The required species and age is usually designated as the most sensitive species or age for the test component in question. If such specific knowledge is not available the most practical choices are made, based on possibilities for purchase and housing conditions. Moreover, animals must be immunologically fit to be subjected to immunizations and blood samplings.

The group sizes for safety studies in non-target animals are not specified in guidelines/regulations, but in general [REDACTED] animals per group are accepted by regulatory authorities.

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:

Not possible because in accordance with international regulations animals that can come into contact with the vaccine have to be used for these studies.

Reduction: In case the numbers of animals to be used are not fixed in regulations, they will be reduced wherever possible without endangering the scientific integrity of the work. This will be achieved through an ongoing evaluation of the observations in each study. The number of animals per study will be substantiated in each study protocol. According to internal procedures, the study protocol will be reviewed by the Animal Welfare Body and a statistician.

Refinement:

International regulations determine to a large extent what sort of data must be generated and this determines which methods have to be employed. Where possible it is pursued to refine the routes of administration of substances and sampling techniques to improve, but without endangering the scientific outcome. For example; blood sampling in rodents is done under anesthesia. See next paragraph for other refinement methods that are applied.

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

In general animals are always housed socially, but animals might have to be [REDACTED] or because of veterinary concerns. Furthermore, to enhance animal welfare, species specific environmental enrichment is provided to all animals.

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed by an experienced veterinarian.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

The vaccines in development are unique and proprietary to the company.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

Some studies may require limited bedding during containment.

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Blood sampling is part of normal farm practice/commonly used biotechnical procedures and will induce only mild discomfort or moderate discomfort of very short duration.

Aesthesia will be applied during blood sampling of [REDACTED]. Anesthesia will not be applied during sampling blood from [REDACTED]. In these species blood sampling causes only mild discomfort or moderate discomfort of very short duration. Applying anesthesia would only increase discomfort as the animal needs to be restrained during administration.

Anaesthesia will not be applied during collection of faeces and urine after spontaneous defecation / urination.

For each species blood sampling and other biotechnical procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) and only well trained personnel will be responsible for the execution (GLP accredited procedures).

As the vaccines to be tested have already been found to be safe in the target species (ruminants) it is very unlikely that they will cause disease in non-target animals.

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

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical

examination of the respective animal will be performed.

In case animals experience discomfort (not related to the treatment), it will be decided in consultation with the veterinarian and Study Director whether to apply adequate veterinary care to alleviate unexpected pain and/or distress (if treatment does not interfere with the test results). In case of severe suffering, humane endpoints are applicable. General humane endpoints are described in an SOP (e.g. the condition of the animal prevents it from eating and drinking regularly, severe loss of body weight) and test specific humane endpoints are given in each study protocol if applicable.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In general, biotechnological procedures such as weighing, taking of rectal temperatures and sampling (swabbing) may result in mild discomfort or moderate discomfort of very short duration, because animals need to be fixated.

Moreover, application of the test article can result in a transient increase in rectal temperature, sometimes accompanied with a reduced level of activity, and a transient vaccination site reaction. Systemic reactions will generally disappear within 24 hours, but local reactions (swelling redness), that are generally painless, can persist for several days and even weeks, but these local reactions do not affect normal behaviour (activity, feeding and drinking).

Explain why these effects may emerge.

These procedures may be part of the experimental design.

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

Rectal temperature measurement and weighing are part of normal veterinary care and will induce only mild discomfort. Taking samples of mucosal surfaces or urine will result in mild discomfort, with the exception of repeated mucosal swabbing, which is considered to be moderate discomfort. Biotechnical procedures have been described in SOPs (GLP accredited procedures).

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.

Safety studies will only induce mild discomfort, it is not expected that humane endpoints need to be applied. *In this case general humane endpoints apply.*

General Humane Endpoints:

- The animal experiences more than minor additional discomfort as a consequence of conditions resulting in long term or non-reversible inability to eat and or drink autonomously, fast or long lasting loss of weight, diseases or conditions that cause severe pain, suffering or discomfort such as bone fractions, force unnatural positioning and / or movements, open wounds or abscesses.
- Scientific endpoints: The target of the study reached / all planned samplings have been performed
- (Reliable and useful) results cannot be reached for reasons unrelated to the study

Indicate the likely incidence.

It is not expected that because of severe discomfort euthanasia needs to be applied.

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').

As the vaccines to be tested have already been found to be safe in the target species (ruminants) it is very unlikely that they will cause disease in non-target animals. However, due to the repeated sampling, the overall discomfort score for the majority of these studies will be moderate.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Postmortem investigation can be part of the experimental design to evaluate (histo)pathological lesions at different organ systems and or to attempt re-isolation of the inoculum from tissues and organs.

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

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

X Yes



Appendix Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

██████████

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

██

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
3	Development: Efficacy studies in ruminants

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.

During development of a vaccine, studies must be carried out to demonstrate that the vaccine is efficacious. In the absence of an immunological correlate for protection, efficacy of a vaccine is demonstrated in vaccination-challenge studies. The design of the studies and parameters tested depend on the disease and/or requirements stated in specific guidelines such, as but not limited, to Ph.Eur general texts and monographs. Animals that have received the recommended vaccination schedule or offspring fed colostrum from vaccinated cows / ewes / goats in case of induction of passive protection and unvaccinated control animals are challenged after a specific interval. Animals vaccinated with a licensed product (██████████ or competitor) might be included as a positive control. Typically, protection is first determined at the time, when the protection is at its optimal level (3-4 weeks post vaccination). Subsequently additional studies might be necessary to demonstrate a shorter onset of immunity and or a longer duration of immunity. The efficacy has to be demonstrated for each of the recommended routes and methods of administration, each species and category (age / gender / pregnant / lactating) of animals for which use of the product is to be recommended and each efficacy claim must be supported by experimental data. For example, claims for protection against ██████████ disease must be supported by evidence of protection from clinical signs of ██████████. Where protection from infection is claimed this must be demonstrated using re-isolation techniques. If more than one claim is made, supporting evidence for each claim is required. A label claim can only be obtained for those parameters for which a statistically significant difference between vaccinates and controls was demonstrated.

In case of ██████████ diseases, it might be necessary to mimic the ██████████ effect of ██████████-factors in order to reach the required sensitivity of the animals to the challenge infection with a single pathogen.

In order to demonstrate compatibility of vaccines (by either mixing or concurrent separate administration), EU guidelines prescribe that in principle for all efficacy claims made for the products protection should be proven by challenge for all components, unless an immunological correlate for protection has been

established.

The following types of efficacy studies are typically needed to be performed:

1. Confirmation of the vaccination schedule / dose level determined during the research phase. If applicable together with the validation of the potency test.
2. Determination of the minimum interval after which protection can be observed (onset of immunity study)
3. Determination of the maximum interval after which protection can be observed (duration of immunity study)
4. Determination of the effect of maternally-derived antibody status on the level of protection (MDA study)

For the majority of vaccines included in the development program of the coming 5 years, there are no immunological correlates of protection (such as protective antibody levels), therefore, ~~In case~~ challenge infection has to take place has to be performed in most of the efficacy studies. One or more of the following parameters are evaluated:

- Clinical signs (e.g. changes in general health and or disease specific symptoms)
- Body temperature (rectal temperature)
- Virus, bacterial or parasites shedding (swabbing of mucosal surfaces, sampling of faeces, urine, milk), viral/bacterial/parasitic load [REDACTED]
- Viraemia, bacteraemia or parasitemia or haematological parameters (blood sampling)
- Post mortem examination (macroscopical and microscopical)

The period during which the animals must be monitored depends on the challenge organism and is often regulated by the applicable guidelines. Typically the observation period covers the period during which the most pronounced disease is expected.

In case a vaccine is intended for protection against transplacental infection, pregnant animals are challenged at one or more specified stage of pregnancy. The animals are then observed until the end of pregnancy to determine the outcome of the pregnancy and the health status of the offspring. Samples might have to be taken from the offspring to determine the presence of the challenge strain or specific pre-colostral antibodies. [REDACTED]

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

Two or more of the following treatments will be employed in order to fulfil the requirements for the specific studies as laid down in the Ph Eur (*in italics the frequency of the treatments*):

1. Vaccine administration [REDACTED]
2. Challenge administration [REDACTED]
3. [REDACTED] treatment by application of [REDACTED] and / or inoculation [REDACTED]
4. Blood sampling [REDACTED] to determine [REDACTED] and / or to determine the presence of the vaccine strain in the blood and / or to determine the presence of the challenge strain in the blood
5. Clinical examination including measurement of rectal temperature [REDACTED]
6. Palpation of the injection site [REDACTED]
7. Weighing [REDACTED]
8. Swabbing of (mucosal) surfaces [REDACTED] to determine the excretion of the vaccine and / or [REDACTED] to determine the excretion of the challenge strain
9. Urine, fecal, colostrum / milk samples [REDACTED] to determine the presence of the challenge strain
10. [REDACTED] to determine the presence of the challenge strain in the [REDACTED]
11. [REDACTED] to determine the presence of the challenge strain in the [REDACTED]

12. Pregnancy check [REDACTED]
13. Euthanasia

The duration of all procedures listed above will only be minutes at most. Typically, the length of the observation period after vaccination is 14 days after each vaccination, unless specified otherwise in a vaccine-specific Ph.Eur monograph. If pregnant animals have to be followed until birth, the observation period will be longer, but in general, the total number of treatments does not increase.

The interval between vaccination and challenge infection or end of the study (in case of surrogate marker for protection) will be chosen in such a way that protection is to be expected. The length of the observation period after challenge infection depends on the incubation period of the pathogen, but is generally 1 to 4 weeks (with maximally 2 weeks of pathogen-induced disease, see under B). To rule out that clinical signs are caused by an unintended co-infection, non-infected control animals may be included in a study. In addition, in models for neonatal disease in sheep and goats, ewes/goats may be required to give birth to and foster the lambs / kids but these will not be infected.

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

For some vaccines, the minimal numbers of animals to be used in efficacy studies with final product are specified in Ph.Eur monographs and (inter)national regulations. If animal numbers are not specified, the minimum numbers of animals needed in the groups to give sufficient likelihood of obtaining a statistically significant result to demonstrate efficacy for the different parameters that should be claimed, will be calculated/estimated by the statistician based on available data and experience. In particular, the variance in the groups together with the magnitude of effect will be used in power calculations to achieve 80% power at the 95% confidence level (regarded by regulatory authorities as the standard by which such experiments should be designed).

In order to warrant that the required minimal number of animals are available for the evaluation of results at the end of the study, it is often necessary to include a number of additional animals at the start of the study. The number of these "additional" animals depends on the specific requirements for the animals (age, antibody status, pregnancy status) and the likelihood of intercurrent death or intercurrent disease that might lead to exclusion from the study. For each study, a thorough evaluation is made to meet the mandatory requirements on animal number for regulatory studies while using the minimum possible number of animals. Likewise, for each study, an evaluation will be made, whether inclusion of (a) control group(s) is mandatory or necessary for a valid test.

B. The animals

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

Studies will be performed in cattle, sheep and / or goats as appropriate. Animals of both sexes can be used for this type of animal experiment unless the study has to be performed in pregnant and / or lactating animals.

Purchase of animals: The animals will be purchased from commercial suppliers, obtained from affiliated farms or bred at MSD facilities.

If a certain microbial status is required, animals will be purchased from farms with the respective (certified) microbiological status and / or screened prior to inclusion in the study.

Special requirements

If young animals with a specific [REDACTED] status are required, it is often necessary to warrant that [REDACTED]. As these [REDACTED] animals are more susceptible for intercurrent infections, they receive [REDACTED] treatment. With the exception of studies against [REDACTED] pathogens, [REDACTED] can be given to the animals from [REDACTED] onwards as an aid in the prevention of [REDACTED]

Age of animals:

Age of the animals for vaccine development varies from a few hours old to adult. The age of the animals to be used should be the minimal age recommended for use of the vaccine.

If very young lambs or kids have to be vaccinated, it might be necessary to include the ewes / goats to foster the lambs / kids. For vaccines intended to be used for pregnant / lactating animals, it may be necessary to include dams in one or more specific trimester of pregnancy, depending on the vaccination schedule to be recommended. Samples might have to be taken from the offspring, for certain studies, euthanasia of the offspring might be required.

The tables below, specify, which models would be used for the different pathogens, that might be included in development projects over the next 5 years. The lists are much more extensive than the actual portfolio will be, but it is not possible at this moment to predict, which pathogens will be worked on.

The animal categories listed are the age groups considered to be most sensitive and therefore have to be used to perform the basic efficacy studies. Additional studies might be necessary to demonstrate the duration of immunity. In this case, challenge studies might be performed in older animals than listed in the tables. As older animals are typically less sensitive the discomfort will be lower for the majority of models, but never higher than in the younger age group. Due to repeated sampling, the cumulative discomfort score for the sampling in these models is moderate.

[Redacted text]

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[Redacted]	Cattle <6 months old	Moderate (max 30%)	Max 1 wk
[Redacted]	Cattle <6 months old	Moderate (max 30%)	Max 1 wk
[Redacted]	Cattle <6 months old	Moderate (max 30%)	Max 1 wk
[Redacted]	Cattle <6 months old	Moderate (max 30%)	Max 1 wk
[Redacted]	Cattle <6 months old	Moderate (max 30%)	Max 1 wk
[Redacted]	Cattle <6 months old	Moderate (max 30%)	Max 1 wk
[Redacted]	Cattle <6 months old	Moderate (max 30%)	Max 1 wk
[Redacted]	Cattle <6 months old	Severe (max 10%)	Max 1 wk
[Redacted]	Cattle <6 months old	Severe (max 10%)	Max 1 wk
[Redacted]	Cattle <6 months old	Moderate (max 30%)	Max 1 wk
[Redacted]	Cattle <6 months old	Severe (max 10%)	Max 1 wk
[Redacted]	Cattle <6 months old	Moderate (max 30%)	Max 2 wk

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
[Redacted]	Cattle <6 months old	Severe (max 10%)	Max 2 wk
[Redacted]	Cattle <6 months old	Severe (max 10%)	Max 2 wk
[Redacted]	Cattle <6 months old	Moderate (max 30%)	Max 1 wk
[Redacted]	Cattle <6 months old	Moderate (max 30%)	Max 1 wk
[Redacted]	Cattle <6 months old	Moderate (max 30%)	Max 1 wk

██████████	Cattle <6 months old	Moderate (max 30%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 months old	Severe (max 10%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 months old	Severe (max 10%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 months old	Moderate (max 30%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 months old	Severe (max 10%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 months old	Moderate (max 30%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 months old	Moderate (max 30%)	Max 1 wk
██████████	Cattle <6 months old	Moderate (max 30%)	Max 1 wk

*Vaccines are given to ██████████ in order to ██████████. This part of the study does only cause mild discomfort. The information given in the table above relates to the discomfort during challenge studies in calves in ██████████ will be determined.

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	Adult cows	Moderate (max 30%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Moderate (max 30%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Mild ²	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Mild ²	Max 2 wk
██████████	Adult ewes	Mild ²	Max 2 wk
██████████	Adult ewes	Mild ²	Max 2 wk

¹: Mandatory model prescribed in a Ph.Eur monograph.

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	Adult cows	Moderate (max 50%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Severe (max 30%)	Max 1 wk
██████████	Adult cows	Severe (max 30%)	Max 1 wk
██████████	Adult cows	Moderate (max 50%)	Max 2 wk
██████████	Adult cows	Severe (max 30%)	Max 1 wk

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	Adult cows	Moderate (max 50%)	Max 2 wk

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	Cattle <6M	Moderate (max 30%)	Max 2 wk

Pathogen	Animal category	Discomfort of disease (% of animals with highest score)	Duration of discomfort
██████████	sheep <6 months	Severe (max 10%)	Max 1-2 d

	cattle<6 months	Moderate (max 50%)	Max 2 wk
	sheep <6 months	Moderate (max 50%)	Max 2 wk
	Adult cows	Severe (max 50%)	Max 1-2 days
	sheep <6 months	Severe (max 30%)	Max 1 wk
	cattle<6 months	Moderate (max 30%)	Max 1 wk
	sheep <6 months	Mild	Max 2 wk
	cattle<6 months	Mild	Max 2 wk
	cattle<6 months	Mild	Max 2 wk
	cattle<6 months	Mild	Max 2 wk
	cattle<6 months	Severe (max 30%)	Max 1-2 d
	cattle<6 months	Moderate (max 50%)	Max 2 wk
	cattle<6 months	Severe (max 30%)	Max 1-2 d
	sheep < 6 months	Severe (max 30%)	Max 1-2 d
	cattle<6 months	Mild	Max 2 wk
	sheep < 6 months		
	cattle<6 months sheep < 6 months	Severe (max 30%)	Max 1-2 d

¹ Efficacy of [redacted] vaccines in ruminants is tested by [redacted] only

Based on the experience over the last 5 years and the current R&D program and priorities, the total expected number of cattle and sheep per age group and discomfort category is the following:

Species	Discomfort score*	Animals <6 Months	Adult**
Cattle	Mild	[redacted]	[redacted]
	Moderate	[redacted]	[redacted]
	Severe	[redacted]	[redacted]
Sheep	Mild	[redacted]	[redacted]
	Moderate	[redacted]	[redacted]
	Severe	[redacted]	[redacted]
Goat	Mild	[redacted]	[redacted]
	Moderate	[redacted]	[redacted]
	Severe	[redacted]	[redacted]

*: Discomfort due to disease

**:[redacted]

***: Due to repeated procedures the overall discomfort will be moderate for at most 50 % of the animals

In efficacy studies, one or more vaccinated groups are compared to an unvaccinated control group. The group size is dependent on the challenge model and the age of the animal at the time of challenge, as for some pathogens the susceptibility for infection/disease will diminish with age, making the use of relatively large group sizes necessary to be able to show a statistically significant difference. In general, the group size used will be [redacted] animals but may go up to [redacted] animals in duration of immunity studies for a limited number of vaccines. The basic set of efficacy studies is identical for all vaccines: dose-response, onset of immunity, duration of immunity (and a study on the interference of maternally derived antibodies if applicable). However, for those pathogens for which multiple sero-/pathotypes exist this same set of experiments may have to be performed several times to show protection against all relevant sero-/pathotypes.

Moreover, in case of multi-valent vaccines, efficacy has to be demonstrated again for each antigen in each new combination vaccine.

If a vaccine is intended for both calves and adults, studies might have to be performed in both categories of animals to demonstrate efficacy for the different parameters claimed for the different age groups. Furthermore, for some countries special requirements exist with regard to the experimental design and the number of groups that have to be tested. The expected numbers per category of vaccine are:

Per Model	Cattle <6Months	Adult cattle	Sheep <6Months	Adult sheep	Goat <6Months	Adult goat
██████████	████	██	██	██	██	██
██████	████	████	██	██	██	██
██████████	████	██	████	████	██	██
████████████████	████	██	████████	██	██	██

For those vaccines that are already under development, still ████████ of the animals will have to be challenged to prove efficacy because of the absence of an immunological correlate of protection. However, for those vaccines that are in the research phase and for which development projects are expected to start during the next 5 years, it is anticipated that this level will decrease.

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.

Re-use might be considered for animals that experience only minor discomfort during the first study, for example uninfected control animals. This approach is considered acceptable especially in case of animals that were raised under special conditions (e.g. ██████████ to achieve a certain ██████████ status).

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement:

In accordance with international regulations, animals of the target species must be used for these studies because there are no suitable alternatives or models for the induction of immunity in a whole organism or for the infection of living tissues as complex as those found in the whole animal in which the vaccines are intended to have efficacy.

Reduction: For most of the efficacy investigations, the minimal number of animals to be used is specified in general or specific guidelines and all measures will be taken to meet the mandatory requirements of the regulatory authorities.

However in order to warrant that the required minimal number of animals are available for the evaluation of results at the end of the study, it is often necessary to include a number of additional animals at the start of the study. The number of these "additional" animals depends on the specific requirements for the animals (age, antibody status, pregnancy status) and the likely hood of intercurrent death or intercurrent disease that might lead to exclusion from the study. For each study, a thorough evaluation is made to meet the mandatory requirements on animal number for regulatory studies while using the minimum possible number of animals.

In case the numbers of animals to be used are not fixed in regulations, they will be reduced wherever possible without endangering the scientific integrity of the work. This will be achieved through an

ongoing evaluation of the observations in each study. The number of animals per study will be substantiated in each study protocol. According to internal procedures, the study protocol will be reviewed by the Animal Welfare Body and a statistician.

Refinement:

International regulations determine to a large extent what sort of data must be generated and this determines which methods have to be employed. Where possible it is pursued to refine the routes of administration of substances and sampling techniques to improve animal welfare/to reduce discomfort of administration, but without endangering the scientific outcome. Ruminants are the target species and there are no other less innervated/sentient species that could be a model for the ruminant diseases that are studied. See next paragraph for other refinement methods that are applied.

The classic method to prove protection of a new vaccine is efficacy in a vaccination-challenge test. However, if immunological correlates of protection (e.g. a serological response) can be used to prove efficacy this will be used rather than challenge infection. When an infection model has to be used, humane endpoints will be employed and staff will be fully trained to recognize animals that experience discomfort. Animals will be closely monitored and additional health checks are performed to ensure that no animal is left suffering.

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

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

Furthermore efforts are made to optimally enrich the environment during containment.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

The vaccines in development are unique and proprietary to the company. To show that vaccines are compatible (combined or associated use), a number of the safety and efficacy studies done with the individual products has to be repeated with the vaccines administered together according to international regulations and guidelines.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

The animals are housed socially, but animals might have to be housed (temporarily) individually without physical contact (but in the same holding room) in order to [REDACTED]
[REDACTED] Some studies may require limited bedding during containment. [REDACTED]
[REDACTED] **In [REDACTED] infection models it is necessary to collect the [REDACTED] in order to perform a visual inspection and to determine the [REDACTED] and / or total amount of [REDACTED]. Therefore, no substrate can be offered in this type of studies.**

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

XYes > 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.

Vaccination, injections (for application of challenge material, injection with [REDACTED] drugs or agents) as well as sampling of blood-are part of normal farm practice/veterinary care and will induce only mild discomfort. If the sampling is repeated [REDACTED] the discomfort is considered to be moderate as a result of the stress during the fixation and handling of the animal.

All biotechnical procedures such as vaccination and blood sampling procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) the procedures are GLP accredited.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Measurement of body temperatures and body weight, sampling urine, faeces, colostrum/milk, sampling on different (mucosal) surfaces [REDACTED] as well as [REDACTED] and pregnancy check are part of normal farm practice/veterinary care and will induce only mild discomfort.

If the following procedures [REDACTED] puncture of [REDACTED] (biopsy) are repeated the discomfort is considered to be moderate.

All biotechnical procedures such as vaccination and sampling procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) and only well trained personnel will be responsible for the execution (GLP accredited procedures).

[REDACTED] animals are more susceptible to disease and might therefore encounter discomfort related to intercurrent diseases. Transport of the animals to the testing facility might cause transient discomfort for the duration of the transport, especially for animals that are transported [REDACTED]

Vaccination can cause a transient increase in rectal temperature, sometimes accompanied with a reduced level of activity, and a transient vaccination site reaction. Systemic reactions generally disappear within 24 hours, but local reactions (that are generally painless) can persist for several days and even weeks. The safety profile of the vaccine compositions used in a development study has typically been determined and found acceptable in the feasibility phase of the project. Therefore, adverse events observed in development studies are in general comparable to those observed after application of commercial vaccines.

Depending on the nature of the challenge inoculum the discomfort of the challenge can range from mild in the absence of any clinical signs (e.g. [REDACTED] to moderate (e.g. [REDACTED] and severe (e.g. [REDACTED]. Vaccination will result in a significant reduction of clinical abnormalities after challenge compared to the unvaccinated control group and thus to a reduction of animals with discomfort.

In case of challenge studies with pathogens that do not cause clinical disease or only very mild disease, it might be necessary to [REDACTED] the animals. These procedures and any effects related to the [REDACTED] treatment are already taken into consideration for the discomfort levels and

durations listed above in the respective tables.

The clinical health status of all animals is checked at least once a day by qualified personnel. Special attention is paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

In consultation with the veterinarian and Study Director, if treatment does not interfere with the test results, it will be decided whether to apply adequate veterinary care including analgesia to alleviate treatment related pain (for example infection studies with ██████ pathogens or ██████ ██████ or pain not related to the treatment. In case of severe suffering, humane endpoints are applicable. General humane endpoints are described in an SOP (e.g. the condition of the animal prevents it from eating and drinking regularly, severe loss of body weight) and test specific humane endpoints are given in each study protocol if applicable.

Explain why these effects may emerge.

These procedures may be part of the experimental design. For vaccines intended for use in young animals, the study design may require that animals are vaccinated and / or infected at ██████ or when only ██████. In these cases, the young animals have to be ██████ accordingly from the farm of birth to the testing facility.

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

All biotechnical procedures will only be performed according to standard procedures described in SOPs (GLP accredited procedures).

The number of samplings will be done in accordance with the respective guidelines or if no requirements are given, the number of samplings is reduced to a minimum number required to for a valid evaluation of results.

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.

To determine the efficacy of a vaccine it is necessary to challenge animals with the pathogenic organism. The severity of discomfort is depending on the nature of the pathogen (see 3.1 of the project proposal for specific clinical signs of the pathogens involved). However, the duration of severe discomfort will be limited due to the application of a humane endpoint if needed. Therefore, pathogen specific humane endpoints are formulated when discomfort is foreseen. These contain information about the clinical signs that can be expected and describe when a humane endpoint has been reached for (a combination of) the respective clinical signs. It also describes the scientific endpoint; the degree of progress of disease that is necessary to be able to draw conclusions about the effectiveness of the treatment tested. The humane endpoints are always leading. These test-specific humane endpoints need to be described in the corresponding study protocol. Each study protocol is reviewed by the AWB before execution of the study. In case it is difficult to reach a decision based on the pre-defined criteria for an endpoint the designated veterinarian is empowered to decide that a humane endpoint is applied/reached.

General humane endpoints are applicable to all animals, irrespectively of the type of experiment.

General Humane Endpoints:

- The animal experiences more than minor additional discomfort as a consequence of conditions resulting in long term or non-reversible inability to eat and or drink autonomously, fast or long lasting loss of weight, diseases or conditions that cause severe pain, suffering or discomfort such as bone fractions, force unnatural positioning and / or movements, open wounds or abscesses.
- Scientific endpoints: The target of the study reached / all planned samplings have been performed
- (Reliable and useful) results cannot be reached for reasons unrelated to the study

Specific humane endpoints after infection with bovine pathogens

- In general, disease specific clinical signs (for example ██████ clinical signs) do not normally lead to humane endpoints, but they may affect the general health of the animal (i.e. high fever, dullness, anorexia) leading to humane endpoints if
 - severe general clinical signs last for at least 2 days or the body temperature drops rapidly

- the animal is unable to stand up and eat/drinking actively for more than 1 day
- In the [REDACTED] are humane endpoints.

Indicate the likely incidence.

Considering the expected number of studies with the different pathogens, the expected number of animals included in the different treatment groups (i.e. treated vs control group) and the expected severity, at most 6 % of the animals is expected to have severe discomfort that would require euthanasia.

K. Classification of severity of procedures

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

For studies without challenge, discomfort will be mild to moderate depending on the number of sampling points. For vaccination-challenge studies, the type and severity of the clinical signs are depending on the type of challenge infection. Similar to natural field infections they may cause mild to severe pain, distress, suffering or even impending death. See B for an overview of the different pathogens involved and the number of animals expected in each discomfort category. Vaccination is expected to reduce the level of discomfort after challenge, but the non-vaccinated control group will experience the symptoms of the natural infection.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Postmortem investigation can be part of the experimental design to evaluate (histo)pathological lesions at the injection sites and or to evaluate the effect of the infection on different organ systems and or to attempt re-isolation of the inoculum from tissues and organs.

In addition, animals vaccinated with a non-licensed vaccine or infected with a pathogen cannot be returned to the farm of origin or transported to another farm to prevent the spread of disease.

Therefore, all animals might have to be euthanized at the end of the study or when a humane endpoint is reached. Control animals that have not been vaccinated and infected may be reused or returned to the farm of origin or transported to another farm. In case of a surrogate immunological marker (no challenge), animals housed on contract farms can remain on the farm or transported to other farms until the end of their natural/economic life.

Moreover, return of the animals to commercial farms or slaughter for human consumption is often prohibited by the current legislation on use of antibiotics.

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

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

X Yes



Appendix Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.

██████████

1.2 Provide the name of the licenced establishment.

██

1.3 List the serial number and type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
4	Development: In vivo potency testing of vaccine batches

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The potency of each vaccine batch used in development studies has to be determined to set the limits for release. Moreover, the potency has to be confirmed at pre-set times for at least 3 batches that are included in a stability monitoring program. The potency testing that have to be performed on commercial batches of licensed vaccines fall out of the scope of this document, as they are performed by a different department. (A separate project proposal will be submitted by that department). Traditionally, the potency of inactivated vaccines, is measured in a so-called *in vivo* potency in ██████████

Apart from the replacement of experimental animals, *in vitro* potency tests are very much preferred over *in vivo* testing for multiple other reasons including costs and timelines. However, for several inactivated vaccines, *in vivo* potency tests are still necessary because it is either not possible to determine the antigen and/or adjuvant content *in vitro* or an *in vivo* batch test is mandatory under the respective legislation (e.g. Ph.Eur monographe).

In such a batch potency test, animals are injected with one or more doses of the vaccine batch. The potency is preferably determined by measuring the antibody response. In a few cases, it is mandatory or necessary for scientific / technical reasons to determine the protection against challenge infection.

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

Two or more of the following treatments will be employed in order to fulfil the requirements for the specific studies as laid down in the Ph Eur (*in italics the frequency of the treatments*):

1. Blood sampling ██████████ to determine ██████████ parameters
2. Test substance administration ██████████

3. Weighing [REDACTED]

4. Euthanasia

The duration of these procedures will only be minutes.

In case of potency tests that involve challenge infection, the following additional treatments are employed

5. Administration of challenge material [REDACTED]

[REDACTED]

6. Clinical observation [REDACTED]

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

For batch potency testing, the number of animals in a group will be the number specified in a vaccine-specific Ph.Eur monograph, or will be such that a statistically significant difference between standard and substandard vaccine batches can be made with 80% power and 95% confidence.

B. The animals

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

For some vaccines, the species to be used for a batch potency test is prescribed in a Ph.Eur monograph. In general, [REDACTED] are preferred over the ruminant target species because they are more genetically homogeneous and better microbiologically controlled.

Based on the experience over the last 5 years and the current R&D program and priorities, the total expected number of laboratory animals is the following:

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Rats and chicken of both sexes will be used, but for [REDACTED] only females will be included in studies because of a higher risk of fighting in male animals and the relatively long time that the animals are in experiment. With regard to the length of these experiments [REDACTED] it is not acceptable to use males, because they would need to be single housed.

Welfare concerns are the basis for the preferred use of female [REDACTED] because they hardly fight. Data from recently executed experiments with male animals have shown that in half of the experiments there was a loss of animals because of severe fighting. This has resulted in the repetition of these experiments and therefore in the use of more animals. A loss of animals due to fighting has never occurred when female animals were used. We consider the aggression and fighting a worrying impairment of welfare. Moreover, the aggression will cause stress, which is known to have effects on the immune system.

In these studies the functioning of the immune system is crucial and variation in the immune response caused by external factors should be avoided as much as possible.

In addition, using animals of both sexes will increase the variability and thereby increase the number of animals needed.

Origin mouse/rabbit/rat/guinea pig:

All animals are supplied by certified vendors accompanied by a health certificate according to FELASA recommendations. All purchased animals have a SPF status.

Origin chicken:

Own SPF poultry breeding unit or commercial vendor.

Rabbits, mice, rats, guinea pigs and chickens are preferred over the ruminant target species because they are more genetically homogeneous and better microbiologically controlled. Therefore, less variance in response and better reproducibility can be achieved, which means that the number of experimental animals can be lower than when using ruminants.

For some vaccines, the type of laboratory animals to be used for a batch potency test is prescribed in a Ph.Eur monograph.

Age of animals:

The required species and age is usually designated as the most sensitive species or age for the test component in question. If such specific knowledge is not available the most practical choices are made, based on possibilities for purchase and housing conditions. Moreover, animals must be immunologically fit to be subjected to immunizations and blood samplings.

The group sizes for potency tests that are specified in guidelines typically range between 5 and 10. For those models that are not described in specific regulations, a group size of [REDACTED] animals is generally accepted by regulatory authorities.

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:

Apart from the replacement of experimental animals, *in vitro* potency tests are very much preferred over *in vivo* testing for multiple other reasons including costs and timelines. Therefore, multidisciplinary teams are active at the company to replace *in vivo* potency tests by *in vitro* tests such as antigenic mass assays for the potency testing of vaccines.

Reduction: The animal species that is expected to give the most discriminatory test with the smallest number of animals will be used. The number of animals per study will be substantiated in each study protocol. Each study protocol will be reviewed by the Animal Welfare Body and a statistician.

Refinement: Following the codes of practice for immunization is the basis for refinement in these animal procedures. Where possible it is pursued to refine the routes of administration of substances and sampling techniques to improve, but without endangering the scientific outcome. For example; blood sampling in rodents is done under anesthesia. See next paragraph for other refinement methods that are applied.

Where ever possible, potency testing will be based on the testing of antibodies or other correlates of protection rather than by challenge.

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

Following the code of practice for immunization and the code of practice for monitoring the welfare of the animals is the basis for refinement in these animal procedures.

In general animals are always housed socially, but animals might have to be (temporarily) separated due to fighting or because of veterinary concerns. Furthermore, to enhance animal welfare, species specific environmental enrichment is provided to all animals.

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

The potency of each vaccine batch used in development studies has to be determined. Moreover, the potency has to be confirmed at pre-set times for the batches that are included in a stability monitoring program.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

Some studies may require limited bedding during containment.

G. Location where the animals procedures are performed

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

X No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Injections (vaccination, inoculation of challenge material) and blood sampling are part of normal veterinary care / commonly used biotechnical procedures and will induce only mild discomfort or moderate discomfort of very short duration.

Anesthesia will be applied during blood sampling of [REDACTED]. Anesthesia will not be applied during sampling blood from [REDACTED]. In these species blood sampling causes only mild discomfort or moderate discomfort of very short duration. Applying anesthesia would only increase discomfort as the animal needs to be restrained during administration.

For each species blood sampling and other biotechnical procedures have been described in Standard Operating Procedures (SOPs) and only well trained personnel will be responsible for the execution (GLP accredited procedures).

As the vaccines to be tested have already been found to be safe in the target species (ruminants) it is very unlikely that they will cause disease in non-target animals.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

In general, biotechnological procedures such as weighing and sampling may result in discomfort, because animals need to be fixated and especially if performed repeatedly.

Moreover, application of the vaccine can result in a transient increase in rectal temperature, sometimes accompanied with a reduced level of activity, and a transient vaccination site reaction. Systemic reactions will generally disappear within 24 hours, but local reactions (swelling redness), that are generally painless, can persist for several days and even weeks, but these local reactions do not affect normal behaviour (activity, feeding and drinking).

Depending on the nature of the challenge inoculum, the discomfort of the challenge can range from mild in the absence of any clinical signs (e.g. [REDACTED]) to moderate (e.g. [REDACTED]) and severe (e.g. [REDACTED]). Vaccination will result in a significant reduction of clinical abnormalities after challenge compared to the unvaccinated control group.

For monitoring of the clinical health status of animals, all study animals will be checked at least once a day by a certified person. Special attention will be paid to the general health of the animals as well as feed and water consumption. All daily observations are recorded. In case of any abnormalities, a clinical examination of the respective animal will be performed.

In case animals experience discomfort (whether or not related to the treatment), it will be decided in consultation with the veterinarian and Study Director whether to apply adequate veterinary care to alleviate unexpected pain and/or distress (if treatment does not interfere with the test results). In case of severe suffering, humane endpoints are applicable. General humane endpoints are described in an SOP (e.g. the condition of the animal prevents it from eating and drinking regularly, severe loss of body weight) and test specific humane endpoints are given in each study protocol if applicable.

Explain why these effects may emerge.

These procedures and if applicable the clinical signs caused by the challenge may be part of the experimental design.

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

Weighing is part of normal veterinary care and will induce only mild discomfort. Taking samples of mucosal surfaces or urine will result in mild discomfort, with the exception of repeated mucosal swabbing, which is considered to be moderate discomfort. Biotechnical procedures have been described in SOPs (GLP accredited procedures).

Unless required by the applicable regulations or scientific reasons, potency testing will be based on the testing of correlates of protection such as antibody levels rather than by challenge.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

In potency tests that require challenge with a pathogenic organism, the severity of discomfort is depending on the nature of the pathogen. However, the duration of severe discomfort will be limited due to the application of a humane endpoint if needed. Therefore, pathogen specific humane endpoints are formulated when discomfort is foreseen. These contain information about the clinical signs that can be expected and describe when a humane endpoint has been reached for (a combination of) the respective clinical signs. It also describes the scientific endpoint; the degree of progress of disease that is necessary to be able to draw conclusions about the effectiveness of the treatment tested. The humane endpoints are always leading. These test-specific humane endpoints need to be described in the corresponding study protocol. Each study protocol is reviewed by the AWB before execution of the study. In case it is difficult to reach a decision based on the pre-defined criteria for an endpoint the designated veterinarian is empowered to decide that a humane endpoint is applied/reached.

General humane endpoints are applicable to all animals, irrespectively of the type of experiment.

General Humane Endpoints:

- The animal experiences more than minor additional discomfort as a consequence of conditions

resulting in long term or non-reversible inability to eat and or drink autonomously, fast or long lasting loss of weight, diseases or conditions that cause severe pain, suffering or discomfort such as bone fractures, force unnatural positioning and / or movements, open wounds or abscesses.

- Scientific endpoints: The target of the study reached / all planned samplings have been performed
- (Reliable and useful) results cannot be reached for reasons unrelated to the study

Indicate the likely incidence.

As the overall majority of potency tests do not require challenge, the incidence of severe discomfort requiring euthanasia is estimated to be less than 2 %.

K. Classification of severity of procedures

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

Discomfort will be mild ($\geq 75\%$) to moderate ($\leq 25\%$) depending on the number of sampling points, type of biotechnical procedure and whether the challenge infection causes disease in the model animal.

Challenge infection will be performed in % of the animals.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Postmortem investigation can be part of the experimental design to evaluate the effect of the challenge infection on different organ systems and or to attempt re-isolation of the inoculum from tissues and organs.

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

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

X Yes

14 juli 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.

Herhaling van antwoorden is niet nodig. Indien van toepassing kan verwezen worden naar een bij een eerdere vraag verstrekt antwoord.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer
2. Titel van het project **Development of new ruminant vaccines**
3. Titel van de NTS **Ontwikkeling en registratie van nieuwe vaccins tegen ziekten bij herkauwers**
4. Type aanvraag: **nieuwe aanvraag projectvergunning**
 -
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC ██████████
 - telefoonnummer contactpersoon ██████████
 - e-mailadres contactpersoon ██████████
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC **2 maart 2017**
 - aanvraag compleet **ja**
 - in vergadering besproken **9 maart 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. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD. **Ja**

Bij de punten 8 t/m 10 kan worden volstaan met 'n.v.t.' wanneer de betreffende acties niet aan de orde zijn geweest.

8. Eventueel horen van aanvrager
 - Datum **9 maart 2017**
 - Plaats ██████████
 - Aantal aanwezige DEC-leden **alleen 1 lid afwezig**
 - Aanwezige (namens) aanvrager **aanvrager zelf**
 - Gestelde vraag / vragen **zie onder (ook schriftelijk gesteld)**
 - Verstrekt(e) antwoord(en) **zie onder (schriftelijk beantwoord)**
 - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
9. Correspondentie met de aanvrager
 - Datum **16 maart 2017**
 - Gestelde vraag/vragen

- Datum antwoord **19 maart 2017**
- Verstrekt(e) antwoord(en)
Vragen vanuit de DEC over het projectvoorstel "Development of new ruminant vaccines" (in rood de reactie van de aanvrager)

Project proposal

- De DEC zou in sectie 3.4.3. graag in een flow-chart de sequentie en coherentie van experimenten willen zien met toegevoegd de go/no-go beslismomenten. **Dit zal in de gewijzigde versie van het voorstel worden aangepast**
- De beschrijving van sommige ziektes is nogal summier. **De beschrijving is in principe voor alle ziektes op dezelfde manier opgebouwd echter is de stand van kennis over bv oorzaak en verspreiding heel verschillend en zijn er niet voor alle ziektes al vaccins beschikbaar.**
- Twee factoren zijn kennelijk van belang bij de ontwikkeling van vaccins. Enerzijds het bevorderen van het welzijn van het gevaccineerde dier, anderzijds kan het een door marketing gedreven aanpak zijn. Kan dit meer in balans gebracht worden? **Dit zal in de tekst aangepast en mogelijk met voorbeelden geïllustreerd worden**

Non-technical summary

- In 3.3 worden verschillende diersoorten opgevoerd. Wat is de reden voor het gebruik van honden? **Alleen vaccin stammen die veilig in het doeldier (rond) zijn, komen in aanmerking voor de development fase. Het gebruik van honden is vereist om onderzoek te doen naar de verspreiding van vaccins in deze diersoort. Er zijn echter geen voorbeelden van vaccins voor herkauwers bekend waarbij vaccinstammen meer ongerief veroorzaken in een niet-target dier dan in het doeldier zelf.**

Appendix 1

- Onder A: Waarom worden de moederdieren geëuthanaseerd? Is het niet mogelijk om de foeten via keizersnede te verkrijgen en de moederdieren te laten leven? **In sommige experimenten kan het ook noodzakelijk zijn om orgaan monsters van de moederdieren te nemen tevens is het humaner om moederdieren te euthanaseren dan ze (stressvol) bij te laten komen van de keizersnede en uiteindelijk te laten slachten omdat het dier niet terug kan naar de boerderij.**
- Onder A: Kan er meer informatie worden gegeven over het doel van de beschreven bemonstering(en) zoals beschreven in de verschillende treatments? (De vraag geldt ook voor de overige appendices) **Het nemen van bloedmonsters is om of het aanwezig zijn van vaccinvirus te bepalen. Dit laatste gebeurt ook in het geval van swabbing van mucosale oppervlaktes en urine, fecale, monsters. Waar nodig zullen meer details worden toegevoegd.**
- Onder F: Wat wordt er precies bedoeld met de opmerking "because of veterinary concerns"? **De opmerking over veterinary concerns kan uit de tekst verwijderd worden aangezien de wet de procedure van het beperken van spreidingsrisico al afdekt.**
- Onder J: Kan er meer informatie over de humane endpoints worden gegeven? **In safety studies is het niet te verwachten dat er veel ongerief zal optreden dit in tegenstelling tot efficacy experimenten beschreven in appendix 3. In de praktijk zal het niet voorkomen dat gewacht wordt tot het "scientific endpoint"; de "humane endpoints" zullen altijd prevaleren.**

Appendix 2

- Onder D: Replacement tekst is onduidelijk. **Er is geen replacement mogelijk, het antwoord is dus nee. Internationale regelgeving vereist dat experimenten dienen te worden uitgevoerd met alle mogelijke dieren die in contact zouden kunnen komen met het vaccin.**

- Onder H: Is het noodzakelijk een ██████████ uit te voeren bij ██████████
Nee, er zal gestreefd worden in deze gevallen monsters te verzamelen na spontane ██████████
- Onder J: Is er wel sprake van humane endpoints hier? Aangezien het te verwachte ongerief bij deze safety studies beperkt is, kan hier nee worden ingevuld.
- Onder K: Kan hier meer informatie over het optreden (in %) van de mate van ongerief worden gegeven? De tekst is gewijzigd: mild ongerief door vaccin, maar in alle gevallen overall moderate vanwege de herhaalde bemonstering.

Appendix 3

- Onder A: Treatments punt 2: wat is de rede voor de ██████████ toedieningswijze? Het huidige projectvoorstel omvat ook ██████████ in dat geval kan het nodig zijn om deze toedieningswijze toe te passen bij een efficacy model voor de betreffende ziekte.
- Onder A: Treatments punt 3: kan er een motivatie voor het gebruik van ██████████ agentia worden gegeven? Het blijkt dat het reproduceren van de praktijksituatie in het laboratorium lastig is. Door het gebruik maken van ██████████ agentia (bijvoorbeeld ██████████) kunnen de dieren gevoeliger worden gemaakt voor het betreffende pathogeen.
- Onder B: Kan er meer informatie gegeven worden in de betreffende tabellen over het "discomfort of disease" en m.n. het % ongerief in gevaccineerde- en controle dieren? In het algemeen zal het ██████████ severe en ██████████ moderate discomfort zijn in niet-gevaccineerde dieren. Voor ziektes waarover minder bekend is, zullen de percentages hoger zijn (conservatieve schatting) De tabellen zullen worden aangepast.

Appendix 4

- Onder A: Waarom worden er nog batch potency testen uitgevoerd? In het registratiedossier dienen de potency resultaten van tenminste █ vaccin batches gemaakt onder productie condities te worden opgenomen. De uiteindelijke vrijgifte (potency) testen zullen worden uitgevoerd door een andere afdeling. Experimenten om de gevoeligheid van de potency test te bepalen zullen worden uitgevoerd in het (nog in te dienen) research project voorstel ruminants.
 - Onder D: Refinement: kan dit meer toegelicht worden? Indien potency testen in dieren worden uitgevoerd, zal de focus liggen op het meten van de ██████████ response maar in sommige gevallen is dat om wetenschappelijke redenen niet mogelijk en zal er naar alternatieve parameters ██████████ gekeken moeten worden.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

10. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) er is geen advies gevraagd aan experts, die geen lid zijn van de DEC.

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek
- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Advies expert

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Is het project vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet)? **Ja**
2. 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. **Er zijn geen DEC leden uitgesloten van de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies.**

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: "Development of new ruminant vaccines". Het project heeft betrekking op dierstudies met de uiteindelijke formulering van nieuwe of verbeterde vaccins voor herkauwers (runderen, schapen en geiten) die worden verricht om het registratiedossier op te bouwen dat nodig is om die vaccins aan te kunnen bieden aan de registratie-autoriteiten in de verschillende afzetgebieden. Voor alle experimenten in dit project geldt dat de wijze van uitvoering ofwel is vastgelegd in richtlijnen die zijn uitgevaardigd door de registratie-autoriteiten (bijvoorbeeld de EP), ofwel in overleg met die autoriteiten wordt bepaald. De fase waarin deze experimenten worden verricht staat bekend als de "development fase". Dit project heeft géén betrekking op experimenten die worden verricht in de daaraan voorafgaande "research fase" noch voor de testen die worden uitgevoerd voor de partijgewijze vrijgifte. Het betreft experimenten die data opleveren over de werkzaamheid, veiligheid en potency van de vaccins. De beschreven dierproeven zijn duidelijk wat betreft de uit te voeren handelingen en daarmee gepaard gaande ongerief voor het individuele dier. De eenvormigheid qua design en het routinematige karakter van de beschreven safety en efficacy studies, ongeachte de ziekteverwekker die het betreft, is volgens de DEC één van de redenen waarom dit project als een toetsbare eenheid kan worden beschouwd. In de overgrote meerderheid van de gevallen zijn het de experimentele procedures, en niet zozeer de aard van de ziekteverwekker of het antigeen, die de mate van welzijnsaantasting van de proefdieren bepalen (zie C11).**
2. Signaleer of er mogelijk tegenstrijdige wetgeving is die het uitvoeren van de proef in de weg zou kunnen staan. Het gaat hier om wetgeving die gericht is op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort (bijvoorbeeld Wet dieren en Flora- en faunawet). **Voor zover bekend bij de DEC zijn er geen aspecten in de aanvraag die niet in overeenstemming zijn met andere wet- en regelgeving.**
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 DEC is van mening dat de genoemde doelcategorieën "translationeel" en "wettelijk verplicht" aansluiten bij de hoofddoelstelling.**

Belangen en waarden

4. Benoem zowel het directe doel als het uiteindelijke doel en geef aan of er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen. Beoordeel of het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C4; zie bijlage I voor voorbeeld*). **Het directe doel van het project is het verzamelen van data met betrekking tot nieuwe vaccins**

voor herkauwers, waarmee een dossier kan worden opgebouwd dat de aanvrager nodig heeft om die vaccins te kunnen registreren en op de markt te kunnen brengen. Het uiteindelijke doel is het reduceren of voorkomen van infecties bij herkauwers door nieuwe of verbeterde vaccins op de markt te brengen. Er is een reële relatie tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

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 belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn de proefdieren, de aanvrager en de doeldieren (herkauwers) en hun eigenaren en de samenleving en de burgers. De proefdieren in het project zullen verschillende niveaus van ongerief ondergaan, waardoor hun welzijn wordt aangetast. De uiteindelijke doeldieren (herkauwers) zullen veel stress en ongerief bespaard blijven, omdat de vaccins bescherming tegen infecties zullen bieden. De aanvrager heeft een aanzienlijk economisch belang bij het op de markt kunnen brengen van vaccins voor herkauwers. Ook de veehouders die hun dieren laten vaccineren hebben een aanzienlijk economisch belang, maar zeker ook een belang vanuit hun zorg voor de dieren, bij het beschikbaar komen van goede en goedkope (combinatie)vaccins die tijdens zo min mogelijk vaccinatiemomenten kunnen worden toegediend. De samenleving en de burgers hebben een direct belang bij het terugdringen van het gebruik van antibiotica in de veehouderij, iets waar vaccins aan bijdragen. Een aantal van de vaccins beschermt de dieren tegen zoönoses die ook voor de mens of andere dieren zoals honden een bedreiging vormen.**
6. Geef aan of er sprake kan zijn van substantiële milieueffecten. Zo ja, benoem deze, leg uit waarom daar sprake van kan zijn en geef aan of deze effecten afgedekt worden door specifieke wet- en regelgeving op het gebied van het omgaan met voor het milieu risicovolle stoffen of organismen. **Er is geen sprake van substantiële milieueffecten. Bij het onderzoek met ziekteverwekkende micro-organismen wordt gewerkt in overeenstemming met de geldende wet- en regelgeving voor inperking van deze organismen. Dieren die gevaccineerd zijn met niet geregistreerde vaccins of die gechallenged zijn met ziekteverwekkers worden gedood om te voorkomen dat producten van die dieren (zoals vlees en melk) in de voedselketen terecht komen.**

Proefopzet en haalbaarheid

7. Beoordeel of de kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven voldoende gewaarborgd zijn. Licht uw beoordeling toe. (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C5*). **De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en infrastructuur beschikt om de doelstelling van het onderzoek binnen de gevraagde termijn te realiseren. Dit wordt ondersteund door het feit dat de aanvrager al eerder succesvol vaccins voor herkauwers heeft ontwikkeld.**
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 van mening de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Het onderzoek wordt voor het grootste deel uitgevoerd in het doeldier, met uitzondering van de dierproeven in bijlage 2 waar in andere diersoorten de veiligheid voor die soorten**

onderzocht zal worden en de potencytesten in bijlage 4. Het behalen van de directe doelstellingen is vooral afhankelijk van het zo strikt mogelijk volgens de richtlijnen en afspraken uitvoeren van de experimenten. De aanvrager heeft daar zeer veel ervaring mee. Alleen vaccins waarvan in de "research fase" is gebleken dat ze naar alle waarschijnlijkheid aan de eisen zullen voldoen, worden in de "development fase" getest. De kans is daardoor relatief klein dat de experimenten toch nog uitwijzen dat de vaccins niet veilig of niet voldoende werkzaam zijn, al komt dit zeker wel eens voor.

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*).

Bedreigde diersoort(en) (10e, lid 4)

Niet-menselijke primaten (10e)

Dieren in/uit het wild (10f)

x Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I richtlijn) **deels aankoop, deels samenwerkingen met boerenbedrijven.**

Zwerfdieren (10h)

x 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 sprake van één of meerdere bijzondere categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. Voor onderzoek naar werkzaamheid en veiligheid van diergeneesmiddelen, waaronder de vaccins vallen, is onderzoek in het uiteindelijke doeldier (runderen, geiten, schapen) wettelijk verplicht. Het is gebruikelijk daarvoor dieren aan te kopen die niet speciaal voor dierproeven zijn gefokt. Ook is het in deze fase gebruikelijk vaccins te testen in praktijkomstandigheden, via samenwerkingen met boerenbedrijven (die voor dat doel geregistreerd zijn bij de NVWA).

- 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 te gebruiken dieren worden in principe gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen gesteld in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU. In een aantal gevallen is (tijdelijk) individuele huisvesting noodzakelijk om overdracht van ziekteverwekkers op andere dieren te voorkomen. Ook is in sommige gevallen om wetenschappelijk redenen niet mogelijk om de dieren bedding te geven. Voor een deel zal het onderzoek plaatsvinden onder praktijk omstandigheden (ligboxen stal, weide). Dit komt overeen met wat in dit type onderzoek gebruikelijk is en is voldoende onderbouwd.**

- 11.** Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische*

handreiking ETK: Stap 1.C2). **Het ongerief van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor het overgrote deel van de dieren in de veiligheidsstudies en in de werkzaamheidsstudies waarin gechallenged wordt met ziekteverwekkers die licht of matig ongerief veroorzaken (respectievelijk 22% en 75%), geldt dat het ongerief vooral bepaald wordt door de bekende routinematige procedures die deel uitmaken van deze experimenten: toediening van het vaccin, monsternames, toediening van de ziekteverwekker en observatie van symptomen. In een veel kleiner deel van de gevallen is het nodig om de dieren in het kader van werkzaamheidsstudies te challengen met ziekteverwekkers die ernstige ziekteverschijnselen kunnen veroorzaken. Daarbij dient te worden aangetekend dat veel van de dieren die met deze ziekteverwekkers worden gechallenged beschermd zullen zijn door het te testen vaccin. Een ernstige aantasting van het welzijn zal zich naar verwachting alleen voordoen in onbeschermd gecontroleerde dieren of dieren die door een lage dosis van het vaccin niet volledig beschermd zijn (maximaal 3% van het totaal aantal dieren in de aanvraag). De aard van deze verschijnselen is voor alle gangbare ziekteverwekkers bekend en in de loop van vele jaren zijn bij ████████ in nauwe samenspraak tussen onderzoekers, proefdierdeskundigen/IvD en de DEC strikte criteria voor humane eindpunten ontwikkeld. Voor alle dieren in de projectaanvraag geldt dat navolgbaar is in welk soort experiment zij zullen worden ingezet, welke handelingen ze zullen ondergaan en welke gevolgen dat heeft voor hun welzijn.**

De kans dat er binnen de looptijd van dit project nieuwe ziekteverwekkers zullen worden aangetroffen is reëel, maar niet heel groot. Aangezien niet vooraf bekend is hoeveel ongerief de infectiemodellen voor deze nieuwe ziekteverwekkers zullen veroorzaken, is voor de zekerheid uitgegaan van ernstig ongerief. Het betreft een beperkt aantal dieren van het totaal en gezien het belang van het zo snel mogelijk indammen van nieuwe infectieziekten, acht de DEC een beperkte mate van onzekerheid over ernst en aard van het ongerief aanvaardbaar.

- 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*). **Elke dierproef vormt, door de vrijheidsbeperking en de aantasting van de lichamelijke integriteit voor instrumentele doeleinden, een aantasting van de integriteit van het dier. Het toedienen van vaccins, het afnemen van bloed en het toedienen van ziekteverwekkers en de gevolgen daarvan, kunnen natuurlijk beschouwd worden als een aantasting van de integriteit van de dieren, maar de DEC is van oordeel dat bij deze handelingen het ongerief (de welzijnsaantasting) op de voorgrond staat. De aantasting van de integriteit van de dieren is daarmee vergeleken beperkt.**
- 13.** Beoordeel of de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en of goed is ingeschat welk percentage dieren naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken. Licht uw beoordeling toe (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 1.C3*). **De aard van de ziekteverschijnselen is voor alle gangbare ziekteverwekkers bekend en in de loop van vele jaren zijn bij ████████ in nauwe samenspraak tussen onderzoekers, proefdierdeskundigen/IvD en de DEC strikte criteria voor humane eindpunten ontwikkeld. Voor elk werkprotocol worden de humane eindpunten en de eindverantwoordelijkheid voor het toepassen daarvan, tot in detail afgestemd met de IvD.**

- 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*). **Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. Herkauwers als runderen en schapen zijn in veel van de experimenten zowel proefdier als doeldier. Bovendien hebben de voorgestelde veiligheids- en werkzaamheidsstudies een sterk routinematig karakter en is het design van de experimenten in veel gevallen tot in detail door de autoriteiten voorgeschreven of met de autoriteiten afgesproken. Voor de huidige doelstelling, registratie van de vaccins, is er geen geaccepteerd vervangingsalternatief voor deze experimenten. Daar waar mogelijk wordt gebruik gemaakt van in vitro 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*). **Voor wettelijk vereiste experimenten liggen de aantallen te gebruiken dieren vast. Wanneer dit niet het geval is, zal het aantal benodigde dieren in de experimenten op basis van een statistische berekening worden bepaald en daarna worden afgestemd met de registratie autoriteiten. De aanvrager heeft op basis van eerdere ervaring met dit soort experimenten een realistische inschatting gemaakt van het totaal aantal te gebruiken dieren.**
- 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 aard van de verwachte ziekte symptomen is voor het merendeel van de ziekteverwekkers bekend en zijn er strikte criteria voor humane eindpunten ontwikkeld. Verder zullen er reagentia ontwikkeld worden om immunologische en serologische assays voor antigeen detectie en -kwantificering op te zetten. Tevens zal onderzocht worden of deze reagentia ook gebruikt kunnen worden om de challenge experimenten om te kunnen zetten in experimenten waarin op basis van analyse van bloedmonsters de werkzaamheid van een vaccin kan worden bepaald. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en is zo opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.**
- 17.** Beoordeel, indien het wettelijk vereist onderzoek betreft, of voldoende aannemelijk is gemaakt dat er geen duplicatie plaats zal vinden en of de aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om tijdens de uitvoering van het project te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Licht uw beoordeling toe. **Het betreft unieke door ████████ te ontwikkelen vaccins. ████████ zal in alle fasen van het onderzoek de proeven zo ontwerpen dat ze voldoen aan wettelijke eisen voor markttoelating.**

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*). **Binnen dit project zullen in principe dieren van beide geslachten in de experimenten gebruikt worden. Daar waar richtlijnen het gebruik van een bepaald geslacht voorschrijven zullen de**

betreffende richtlijnen gevolgd worden. De DEC is van oordeel dat het voor de hand ligt dat vaccins die bijvoorbeeld bedoeld zijn voor dieren die lacteren of drachtig zijn, getest worden worden in de vrouwelijke doeldieren. In het geval van muizen en cavia's verdient het (op grond van eerdere ervaringen) de voorkeur om alleen met vrouwelijke dieren te werken om vechten bij mannelijke dieren te voorkomen. De mannelijke dieren solitair huisvesten, zodra het vechten zich voordoet, is geen acceptabele oplossing, omdat het vaak langdurige experimenten betreft. Solitaire huisvesting beïnvloedt de resultaten (een reden waarom in dat geval alle dieren solitair gehuisvest moeten worden). Vechten kan ook leiden tot extra uitval van dieren en mislukken van de experimenten.

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*). **In het project zullen een aantal (maar niet alle) dieren worden gedood aan het einde van het experiment. De DEC is er van overtuigd dat dit alleen gebeurt als het voor de doelstelling noodzakelijk is om na afloop van de proef weefsels te isoleren of als de dieren met ziekteverwekkers of niet geregistreerde vaccins behandeld zijn en mogelijk een gevaar vormen voor hun omgeving of het milieu. De aanvrager gebruikt methoden die beschreven zijn in bijlage IV van de richtlijn 2010/63/EU.**

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is. **In alle gevallen waarin het niet noodzakelijk is om de gebruikte landbouwhuisdieren te doden (zie criteria onder C19), wordt de mogelijkheid van hergebruik actief onderzocht. In veel gevallen wordt hergebruik ook gerealiseerd.**

NTS

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

D. Ethische afweging

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

2. Weeg voor de verschillende belanghebbenden, zoals beschreven onder C5, de sociale en morele waarden waaraan tegemoet gekomen wordt of die juist in het geding zijn, ten opzichte van elkaar af. Om dit proces te vergemakkelijken, kunt u de belangrijkste belanghebbenden en de belangrijkste waarden die in het geding zijn waarderen. U kunt dit verwoorden in termen van gering, matig of veel/ernstig voordeel of nadeel.

Geef aan waarom de DEC bevordering van waarden (baten) voor de ene belanghebbende prevaleert boven de aantasting van waarden (kosten) voor de andere belanghebbende (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.B; zie bijlage I voor voorbeelden*).

Voor het merendeel van de dieren (97%) die gebruikt worden in de voorgestelde experimenten leiden de experimenten tot licht of matig ongerief en een beperkte aantasting van hun integriteit. Als de werkzaamheid van de vaccins wordt getest kan dit voor een klein deel van de dieren (3% van het totaal) leiden tot ernstig ongerief, omdat in de challengeproeven niet gevaccineerde controlegroepen moeten worden meegenomen. De onderzoekers doen deze challengeproeven slechts als er geen geaccepteerd alternatief voorhanden is. De duur en de ernst van het ongerief worden door de onderzoekers zoveel mogelijk beperkt.

Daar staat tegenover dat het op de markt brengen van nieuwe of verbeterde vaccins tegen infectieziekten zal bijdragen aan het verminderen van de kans op het uitbreken van infectieziekten in de doeldieren. Dit bespaart grote aantallen dieren veel leed.

De aanvrager heeft een groot economisch belang bij het op de markt kunnen brengen van de te testen vaccins en kan dit alleen doen als hij door middel van de voorgestelde dierproeven aantoont dat ze werkzaam en veilig zijn.

De houders en eigenaren van de dieren hebben eveneens een groot economisch belang bij het beschikbaar komen van goede en zo goedkoop mogelijke vaccins. Bij een ziekte-uitbraak op hun bedrijf leiden ze grote economische schade. Als zij hun dieren goed en goedkoop kunnen beschermen verbetert dat hun concurrentiepositie. Ook hebben veehouders vanuit hun zorg voor de dieren belang bij het beschikbaar komen van goede vaccins.

Ziekte-uitbraken bij herkauwers kunnen in een samenleving waarin het houden van runderen en schapen voor de productie van vlees en zuivel een grootschalige economische activiteit is, tot ernstige ontwrichting van die samenleving leiden en voor grote economische schade zorgen, ook buiten de veehouderij. Het kunnen beschikken over goede vaccins is een substantieel belang. De aanvrager draagt daaraan bij.

Tot slot dragen vaccins bij aan een beperking van het gebruik van antibiotica in de veehouderij en, voor zover de vaccins bescherming bieden tegen zoönoses, beschermen ze ook mensen tegen het oplopen van zoönoses. Het maatschappelijk belang daarvan is groot.

De DEC acht de economische belangen van de aanvrager en van de dierhouders op zich legitiem en zij leggen zeker enig gewicht in de schaal, maar alleen in combinatie met het grote maatschappelijk belang en de voordelen voor de doeldieren, namelijk betere vaccins en minder vaccinatiemomenten, rechtvaardigen ze het gebruik van de dieren in de experimenten.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden. Maak daarnaast gebruik van de volgende moreel relevante feiten: belang onderzoek (C4), kennis en kunde van betrokkenen (C7), haalbaarheid doelstellingen (C8), categorieën en herkomst dieren (C9), 3V's (C14-C18), ongerief (C10-13 en C19) en relevante wet en regelgeving (C2). Onderbouw hoe al deze elementen zijn meegewogen bij de beantwoording van de centrale morele vraag, zodanig dat het navolgbaar is zonder gedetailleerde kennis te hebben van het projectvoorstel (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 3.C; zie bijlage I voor voorbeeld*). **De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen beschreven in het projectvoorstel "Development of new ruminant vaccines". Volgens de DEC wegen de voordelen voor de doeldieren, de samenleving, de aanvrager en de houders van de dieren zwaarder dan de nadelen voor de gebruikte proefdieren. Het project is goed opgezet. Verder is de DEC van mening dat de aanvrager voldoende kennis en kunde heeft om te kunnen voldoen aan de 3V beginselen en dat de aanvrager ervoor zal zorgen dat**

het ongerief van de proefdieren zoveel mogelijk beperkt zal worden. Gelet op het bovenstaande is de DEC unaniem van oordeel dat voor het project "Development of new ruminant vaccines" het gebruik van de proefdieren gerechtvaardigd is.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

x Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.

Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist

Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...

De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...

De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies kan unaniem tot stand zijn gekomen dan wel gebaseerd zijn op een meerderheidsstandpunt in de DEC. Indien gebaseerd op een meerderheidsstandpunt, specificieer het minderheidsstandpunt op het niveau van verschillende belanghebbenden en de waarden die in het geding zijn (*Zie Praktische handreiking ETK: Stap 4.A; zie bijlage I voor voorbeeld*). **Het 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*).

De aanvrager stelt in de aanvraag: "One aspect is however constant across the whole ruminant health market: the trend for increasing animal productivity and growing farm/herd size, which is worsening the impact of infectious diseases". De DEC wil in dat verband opmerken dat dit advies is geschreven vanuit het perspectief van een samenleving waarin de grootschalige productie van vlees en zuivel tegen een zo laag mogelijke prijs een geaccepteerde economische activiteit is. Op de wereldwijde markt is de concurrentiedruk groot. Wanneer die economische context als een onontkoombaar gegeven wordt aangenomen, dan weegt het belang van dit onderzoek op tegen het ongerief van de dieren die er voor gebruikt worden.

Het is de unanieme mening van de DEC dat de druk om zo goedkoop mogelijk (en per dier zo veel mogelijk) te produceren tot niet optimale leefomstandigheden en relatief kwetsbare dieren leidt. Vooral bij runderen (melkvee en kalveren) is dit het geval. Een relatief kwetsbare gezondheid en niet optimale leefomstandigheden kunnen op zichzelf al bijdragen aan het ontstaan van ziekten.

De DEC zou het betreuren als het beschikbaar komen van steeds betere vaccins tegen allerlei ziekten bij herkauwers ertoe leidt dat er niets gedaan wordt om de leefomstandigheden en de robuustheid van de dieren te verbeteren. Het beter afstemmen van de leefomstandigheden op de natuurlijke behoeften van de dieren zal weliswaar niet in alle gevallen (volledig) het uitbreken van ziekten kunnen voorkomen, en dus ook vaccins niet overbodig maken, maar het kan wel

14 juli 2016

het welzijn van de dieren aanmerkelijk verbeteren. De DEC van [REDACTED] zou het toejuichen wanneer dit in striktere richtlijnen wordt vastgelegd.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD [REDACTED] 20171630
Bijlagen
2

Datum 2 mei 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 mei 2017. Het gaat om uw project "Development of nieuw ruminant vaccines". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD [REDACTED] 20171630. 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:

2 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD [REDACTED] 20171630

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
2 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD [REDACTED] 20171630

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: [REDACTED]
Naam instelling of organisatie: [REDACTED]
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: [REDACTED]
Straat en huisnummer: [REDACTED]
Postbus: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED]
IBAN: [REDACTED]
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
2 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD [REDACTED] 20171630

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 september 2017
Geplande einddatum: 1 september 2022
Titel project: Development of nieuw ruminant vaccines
Titel niet-technische samenvatting: Ontwikkeling en registratie van nieuwe vaccins tegen ziekten bij herkauwers
Naam DEC: [REDACTED]
Postadres DEC: [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.684,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

[REDACTED]

Datum:

2 mei 2017

Datum:

2 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD [REDACTED] 20171630



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD [redacted] 20171630
Bijlagen
2

Datum 2 mei 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 2 mei 2017
Vervaldatum: 1 juni 2017
Factuurnummer: 171630

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD [redacted] 20171630	€ 1.684,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



**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
AVD [REDACTED] 20171630

Datum 10 mei 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 2 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development of nieuw ruminant vaccines" met aanvraagnummer AVD [REDACTED] 20171630. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

Kunt u per infectie of -groep aangeven hoe vaak deze voorkomt en wat de impact van de infectie is op de dieren? Kunt u ook aangeven of er al vaccins aanwezig zijn tegen deze infectie en waarom het nodig is nieuwe vaccins te ontwikkelen?

Bij uw strategie mist een onderbouwing van de keuzemomenten. Het is niet helder wanneer welke keuze gemaakt wordt. Bijvoorbeeld, wat is al bekend van de vaccins die u in vivo wilt gaan testen, voordat u deze vaccins in een dierproef gaat testen. Wanneer besluit u een nieuw diermodel op te zetten of een bestaand diermodel te verbeteren? Wanneer besluit u niet verder te gaan met de ontwikkeling van een bepaald vaccin? Welke strategie zult u volgen voor optimalisatie van reeds bestaande vaccins en welke voor nieuw te ontwikkelen vaccins?

Kunt u aangeven om welke redenen de huisvesting van dieren in Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.3 zonder substraat zal zijn, welke afweging

wordt hierbij gemaakt?

Hoeveel dieren ondergaan in Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.3 matig ongerief vanwege herhaling van handelingen?

Kunt u voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.4 aangeven hoeveel dieren welk ongerief zullen ondergaan? Kunt u aangeven welke infectiemodellen zullen leiden tot ernstig ongerief? U noemt enkele voorbeelden, maar kunt u dit uitbreiden?

Kunt u voor Bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.4 met wetenschappelijke argumentatie aangeven waarom mannelijke dieren niet gebruikt kunnen worden in het experiment? Ongerief als gevolg van individuele huisvesting is niet voldoende argumentatie. Als onvoldoende is onderbouwd waarom het gebruik van één geslacht nodig is, kan de CCD een voorwaarde opleggen dat beide geslachten in gelijke mate gebruikt moeten worden.

Kunt u de humane eindpunten in alle Bijlage Dierproeven beter beschrijven, inclusief ziektespecifieke humane eindpunten?

Hoeveel vaccins/ infecties verwacht u in totaal te onderzoeken? Is het voor alle onderzoeken nodig honden in te zetten, of slechts voor enkele infecties? Kunt u dan aangeven voor welke infecties dit geldt?

Kunt u dit verwerken in nieuwe Bijlagen Dierproeven en een nieuw Projectvoorstel?

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.

Datum:

10 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD [REDACTED] 20171630

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Datum:

10 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD [REDACTED] 20171630

Geachte CCD,

Bijgevoegd zijn de antwoorden op gestelde vragen vanuit CCD n.a.v. brief 10 mei 2017. Uw referentie is: Aanvraagnummer ADV [REDACTED] 20171630 m.b.t Project: Development of new ruminant vaccines.

In groen zijn de antwoorden weergegeven. Naar aanleiding van deze vragen zijn ook de documenten Project proposal, Bijlagen beschrijving dierproeven en de NTS aangepast. Ook hierin zijn de aanpassingen met groene tekst weergegeven.

We hopen u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben. Indien er nog vragen zijn, dan vernemen wij deze graag.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

Geachte [REDACTED]

Op 2 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development of new ruminant vaccines" met aanvraagnummer AVD [REDACTED] 20171630. 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.

Onduidelijkheden

Vraag:

Kunt u per infectie of -groep aangeven hoe vaak deze voorkomt en wat de impact van de infectie is op de dieren? Kunt u ook aangeven of er al vaccins aanwezig zijn tegen deze infectie en waarom het nodig is nieuwe vaccins te ontwikkelen?

Antwoord:

Dit vaccine development project richt zich enkel op ziektes, die een beduidende impact op de herkauwer (rund, schaap, geit) industrie hebben (dierenwelzijn, productieverlies of behandelingskosten) en / of impact op humane gezondheid (zoönoses en reductie in het gebruik van antibiotica). Over het algemeen zal er alleen gewerkt worden aan ziektes met hoge incidentie in de (Europese) runderpopulatie of aan exotische ziektes, die een bedreiging voor de Europese runderpopulatie vormen.

In d eproject proposal onder het kopje "Diseases within the Ruminant Vaccine Development Project" (3.1. Background) is hierover uitleg toegevoegd, tevens is voor de specifieke ziektes, indien van toepassing, informatie over incidentie, impact en / of beschikbaarheid en noodzaak voor vaccins toegevoegd.

Vraag:

Bij uw strategie mist een onderbouwing van de keuzemomenten. Het is niet helder wanneer welke keuze gemaakt wordt. Bijvoorbeeld, wat is al bekend van de vaccins die u in vivo wilt gaan testen, voordat u deze vaccins in een dierproef gaat testen. Wanneer besluit u een nieuw diermodel op te zetten of een bestaand diermodel te verbeteren? Wanneer besluit u niet verder te gaan met de ontwikkeling van een bepaald vaccin? Welke strategie zult u volgen voor optimalisatie van reeds bestaande vaccins en welke voor nieuw te ontwikkelen vaccins?

Antwoord:

Zoals reeds in project proposal bij 3.4.3. aangegeven, zullen enkel de vaccin kandidaten in

de developmentfase onderzocht worden, van wie het op basis van het in de research fase bepaalde veiligheids- en werkzaamheidsprofiel aannemelijk is dat deze ook de developmentfase met success zullen doorlopen.

Ter verduidelijking wordt deze informatie ook in 3.4.1. nog een keer toegevoegd; *'Due to the complexity of vaccination-challenge studies in ruminants, only the most promising vaccine candidates for which the safety and efficacy data obtained during the research phase indicate a high probability of success are approved for further development. Selection criteria comprise the growth characteristics, immunological properties determined in vitro, safety and efficacy data obtained from other vaccines (ruminants and non ruminants).'*

Opzetten of verbeteren van diermodellen, vindt in de research fase plaats en wordt daarom in deze aanvraag niet verder behandeld.

Verder is bij 3.4.3. een zin toegevoegd om uit te leggen, wanneer voor het optimaliseren van een bestaand of het ontwikkelen van een nieuw vaccin gekozen wordt: *'If the company markets already a vaccine against the specific disease, an evaluation will be made, whether that vaccine can be updated, which in most cases is the preferred situation because less studies are required, or a new vaccine candidate needs to be further developed. Only vaccine candidates for which the safety and efficacy data obtained during the research phase indicate a high probability of success are approved for further development'*.

Vraag:

Kunt u aangeven om welke redenen de huisvesting van dieren in Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.3 zonder substraat zal zijn, welke afweging wordt hierbij gemaakt?

Antwoord:

Bij [REDACTED] infectiemodellen is het noodzakelijk, de faeces schoon te verzamelen, om deze visueel goed te kunnen beoordelen en bij voorbeeld de droge stof en / of de totale hoeveelheid faeces te kunnen bepalen. In dit type studies kan er daarom geen substraat aangeboden worden. Tekst in Bijlage Beschrijving Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2. als volgt aangepast:

'In a few cases [REDACTED] model), it is necessary to use no bedding because of scientific reasons'.

Vraag:

Hoeveel dieren ondergaan in Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.3 matig ongerief vanwege herhaling van handelingen?

Antwoord:

Bij de beoordeling van het ongerief vanwege herhaling van handelingen werd voor de meeste procedures in eerste instantie een te strenge classificatie toegepast: Het herhaaldelijk nemen van [REDACTED] of meer [REDACTED] toepassen van de volgende procedures: meten van de lichaamstemperatuur, gewicht, nemen van urine, faeces, colostrum/melk of het bemonsteren van mucosale oppervlaktes [REDACTED] [REDACTED] werd als matig ongerief beoordeeld. Aangezien het niet-invasieve handelingen betreft, is het te rechtvaardigen, het ongerief ter gevolge van herhaaldelijke toepassing van deze procedures als mild te beoordelen.

Ongerief ten gevolge van herhaaldelijke [REDACTED] en [REDACTED] [REDACTED] is echter wel als matig te beschouwen. Deze procedures worden enkel bij [REDACTED] infectiemodellen toegepast.

In de betreffende tabel in bijlage 3.4.4.1. waarin aangegeven wordt, hoeveel dieren welke ongerief zullen ondervinden zal worden aangegeven, hoeveel dieren (%) matige ongerief ter gevolge van de herhaalde procedures ondervinden.

In de betreffende tabel in bijlage 3.4.4.3. waarin aangegeven wordt, hoeveel dieren welke ongerief zullen ondervinden zal worden aangegeven, hoeveel dieren (%) matige ongerief ter gevolge van de herhaalde procedures ondervinden. Bij de tabellen voor infectie

modellen waar deze procedures niet toegepast zullen worden, wordt de voetnoot ⁴²:
Although discomfort of disease is mild, overall study discomfort will be moderate as a result of repeated sampling” verwijderd.

Onder Punt I is de tekst als volgt aangepast:

Measurement of body temperatures and body weight, sampling urine, faeces, colostrum/milk, sampling on different (mucosal) surfaces

as well as and pregnancy check are part of normal farm practice/veterinary care and will induce only mild discomfort. 'If sampling or are repeated the discomfort is considered to be moderate'.

De verdeling van dieren over de verschillende ongeriefscores in de NTS zal ook worden aangepast.

Vraag:

Kunt u voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.4 aangeven hoeveel dieren welk ongerief zullen ondergaan? Kunt u aangeven welke infectiemodellen zullen leiden tot ernstig ongerief? U noemt enkele voorbeelden, maar kunt u dit uitbreiden?

Antwoord:

Naar aanleiding van uw vraag realiseren we ons, dat de tekst mogelijk misleidend is. Er zijn infectie modellen die tot ernstig ongerief leiden echter verwachten we gedurende de komende 5 jaar geen van deze modellen toe te passen. We verwachten dat niet meer dan 25% van de dieren matig ongerief zal ondervinden, ten gevolge van de handelingen of de infectie.

De tekst is als volgt aangepast:

'Discomfort will be mild ($\geq 75\%$) to moderate ($\leq 25\%$) depending on the number of sampling points, type of biotechnical procedure and whether the challenge infection causes disease in the model animal'.

Vraag:

Kunt u voor Bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.4 met wetenschappelijke argumentatie aangeven waarom mannelijke dieren niet gebruikt kunnen worden in het experiment? Ongerief als gevolg van individuele huisvesting is niet voldoende argumentatie. Als onvoldoende is onderbouwd waarom het gebruik van één geslacht nodig is, kan de CCD een voorwaarde opleggen dat beide geslachten in gelijke mate gebruikt moeten worden.

Antwoord:

Bij de in bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.4 beschreven experimenten en met name in het geval van de potency testen is standaardisatie van uitgesproken belang. Bij gebruik van dieren van beide geslachten wordt een additionele variabele in de proefopzet toegevoegd, wat onvermijdelijk tot een grotere variabiliteit in de resultaten zal leiden. Om de zelfde mate aan betrouwbaarheid van de resultaten te waarborgen zou het aantal dieren dat per experiment nodig is verhoogd moeten worden. Gebruik van alleen vrouwelijke dieren leidt tot het totaal laagst mogelijk aantal dieren.

Vraag:

Kunt u de humane eindpunten in alle Bijlage Dierproeven beter beschrijven, inclusief ziektespecifieke humane eindpunten?

Antwoord:

Onderstaande informatie is toegevoegd in alle bijlagen:

General humane endpoints are applicable to all animals, irrespectively of the type of experiment.

General Humane Endpoints:

- *The animal experiences more than minor additional discomfort as a consequence of conditions resulting in long term or non-reversible inability to eat and or drink autonomously, fast or long lasting loss of weight, diseases or conditions that cause severe pain, suffering or discomfort such as bone fractures, force unnatural positioning and / or movements, open wounds or abscesses.*
- *Scientific endpoints: The target of the study reached / all planned samplings have been performed*
- *(Reliable and useful) results cannot be reached for reasons unrelated to the study*

Onderstaande informatie is toegevoegd in alle bijlagen betreffende infectiestudies:

Specific humane endpoints after infection with bovine pathogens

- *In general, disease specific clinical signs (for example ██████████ ██████████ do not normally lead to humane endpoints, but they may affect the general health of the animal (i.e. high fever, dullness, anorexia) leading to humane endpoints if*
 - *severe general clinical signs last for at least 2 days or the body temperature drops rapidly*
 - *the animal is unable to stand up and eat/dring actively for more than 1 day*
- *In the reproductive infection models, calving or abortion are humane endpoints.*

Vraag

Hoeveel vaccins/ infecties verwacht u in totaal te onderzoeken?

Antwoord

We verwachten gedurende de komende 5 jaar met ██████████ pathogenen development studies te verrichten (in vele gevallen zal een vaccin antigenen van meerdere pathogenen bevatten).

Zin toegevoegd in de project proposal onder kopje 3.4. *"It is expected that ██████████ pathogens will be investigated within this project"*

Vraag:

Is het voor alle onderzoeken nodig honden in te zetten, of slechts voor enkele infecties? Kunt u dan aangeven voor welke infecties dit geldt?

Antwoord:

Het is zeker niet nodig om voor alle onderzoeken honden in te zetten, alleen maar in de uitzonderlijke gevallen van infecties bij herkauwers, waarbij de hond een gastheer is. Zoals de naam al suggereert is dit het geval bij ██████████.

Toegevoegd in bijlage 3.4.4.4.: *Required for exceptional ruminant pathogens for which dogs are an alternative host, such as ██████████*

Geachte CCD,

Bijgevoegd zijn de antwoorden op gestelde vragen vanuit CCD n.a.v. brief 6 juni 2017.

Uw referentie is: Aanvraagnummer [REDACTED]
[REDACTED] en AVD [REDACTED] 20171630 (Development of new ruminant vaccines).

In paars zijn de antwoorden weergegeven. Naar aanleiding van deze vragen zijn ook de documenten Bijlagen beschrijving dierproeven aangepast. Ook hierin zijn de aanpassingen met parse tekst weergegeven.

We hopen u hiermee voldoende geïnformeerd te hebben. Indien er nog vragen zijn, dan vernemen wij deze graag.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

From: Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]

Sent: dinsdag 6 juni 2017 16:51

To: [REDACTED]

Cc: [REDACTED]

Subject: RE: Aanhouden [REDACTED] en AVD [REDACTED] 20171630

Geachte [REDACTED]

In aanvulling op de eerder gestelde vragen, hebben wij nog enkele vragen over aanvragen [REDACTED] en AVD [REDACTED] 20171630.

[REDACTED] *dieren:*

In Bijlage Dierproeven [REDACTED] en in Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.3 van aanvraag AVD [REDACTED] 20171630 worden ook [REDACTED] dieren en [REDACTED] genoemd. In de Wet op de dierproeven staat dat deze wet ook van toepassing is op [REDACTED] van zoogdieren [REDACTED]

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
te ondervinden.

Zijn de [REDACTED] dieren meegenomen in de [REDACTED]
Kunt u een inschatting maken om hoeveel [REDACTED] het zal gaan, per Bijlage Dierproeven? Is hierbij ook rekening gehouden met het ongerief van de [REDACTED] dieren?

Indien de [REDACTED] dieren niet meegenomen zijn in de aantallen, kunt u dan nieuwe Bijlagen Dierproeven sturen, waarin deze aantallen zijn verwerkt? Anders kunt u de overige vragen (aantal dieren en ongerief) beantwoorden zonder nieuwe Bijlagen Dierproeven. –

De aantallen en het ongerief waren al meegenomen, echter stonden de [REDACTED] dieren als "cattle / sheep <6 maanden" vernoemd bij de [REDACTED] modellen. Dit is in de nieuwe Bijlage Dierproeven [REDACTED] en Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.3 van aanvraag AVD [REDACTED] 20171630 aangepast. De betreffende aantallen zijn nu in de regel "reproductive model" weergegeven.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

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

Onze referentie
Aanvraagnummer
[REDACTED] 20171630
Bijlagen
1

13 JULI 2017

Datum 12 juli 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 2 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Development of new ruminant vaccines" met aanvraagnummer AVT [REDACTED] 20171630. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 23 mei en 9 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof meer achtergrondinformatie over de infecties, onderbouwing van de keuzemomenten, de reden van afwijkende huisvesting, het te verwachten ongerief van de dieren, onderbouwing van het gebruik van vrouwelijke dieren, betere beschrijving van de humane eindpunten, het totaal aantal te onderzoeken vaccins, het aantal nakomelingen dat gebruikt wordt in het project, het ontbreken van bedding in sommige studies, het aantal dieren dat een challenge zal ondergaan en meer informatie over studies ten behoeve van de niet Europese markt.

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.

Er is gevraagd om wetenschappelijk te onderbouwen waarom niet beide geslachten gebruikt kunnen worden. Uw antwoord hierop is niet voldoende onderbouwd, daarom moeten voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.2 en 3.4.4.4 beide geslachten in evenredige aantallen gebruikt worden. Testen voor toelating buiten de Europese markt waarbij de eisen hiervoor strenger zijn

dan de Europese Farmacopee, mogen enkel uitgevoerd worden na het indienen van een wijziging en de goedkeuring daarop.

Datum:
12 juli 2017
Aanvraagnummer:
[REDACTED] 20171630

U kunt met uw project "Development of new ruminant vaccines" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een looptijd van maximaal 5 jaar kan hebben.

[REDACTED]
vaccins te [REDACTED]
[REDACTED]

Voor het vervoer van jonge of drachtige dieren wordt Bijlage I, Hoofdstuk 1 van de Europese Transportverordening (EG nr. 1/2005) in acht genomen. 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. Er is sprake van ernstig ongerief.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie [REDACTED] [REDACTED] gevoegd. Dit advies is opgesteld op 2 mei 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.

Datum:
12 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD [REDACTED] 20171630

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:

[REDACTED]
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: [REDACTED]

Adres: [REDACTED]

Postcode en plaats: [REDACTED]

Deelnemersnummer: [REDACTED]

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 september 2017 tot en met 31 augustus 2022, voor het project "Development of new ruminant vaccines" met aanvraagnummer AVI [REDACTED] 20171630, volgens advies van Dierexperimentencommissie MSD Animal Health. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies. Er worden aanvullende voorwaarde(n) gesteld. Beide geslachten moeten worden gebruikt in Bijlage 3.4.4.2 en 3.4.4.4 en testen voor toelating buiten de Europese markt zijn niet toegestaan indien hiervoor meer dieren nodig zijn of er sprake is van meer ongerief dan de Europese Farmacopee.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 2 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 2 mei 2017, ontvangen op 2 mei 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 23 mei en 9 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVL [REDACTED] 20171630

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Development: Safety studies in ruminants				Runderen: [REDACTED] kalveren < 6 maanden; [REDACTED] volwassen dieren Schapen: [REDACTED] lammeren < 6 maanden; [REDACTED] volwassen dieren Geiten: [REDACTED] lammeren < 6 maanden; [REDACTED] volwassen dieren
	Runderen (Bos taurus) /	[REDACTED]	[REDACTED] % Matig [REDACTED] % Licht	
	Schapen (Ovis aries) /	[REDACTED]	Licht	
	Geiten (Capra aegagrus hircus) /	[REDACTED]	Licht	
3.4.4.2 Development: Safety studies in non-target animals				
	Konijnen (Oryctolagus cuniculus) /	[REDACTED]	Matig	
	Muizen (Mus musculus) /	[REDACTED]	Matig	
	Ratten (Rattus norvegicus) /	[REDACTED]	Matig	
	Kippen /	[REDACTED]	Matig	
	Varkens (Sus scrofa domesticus) /	[REDACTED]	Matig	

Aanvraagnummer:
AVI [redacted] 20171630

	Honden (<i>Canis familiaris</i>) / [redacted]	[redacted]	Matig	
3.4.4.3 Development: Efficacy studies in ruminants				Runderen: [redacted] kalveren <6 maanden; [redacted] volwassen dieren Schapen: [redacted] lammeren <6 maanden; [redacted] volwassen dieren Geiten: [redacted] lammeren < 6 maanden; [redacted] volwassen dieren
	Runderen (<i>Bos taurus</i>) / [redacted]	[redacted]	[redacted] % Ernstig [redacted] % Matig [redacted] % Licht	
	Schapen (<i>Ovis aries</i>) / [redacted]	[redacted]	[redacted] % Ernstig [redacted] % Matig [redacted] % Licht	
	Geiten (<i>Capra aegagrus hircus</i>) / [redacted]	[redacted]	[redacted] % Ernstig [redacted] % Matig [redacted] % Licht	
3.4.4.4 Development: In vivo potency testing of vaccine batches				
	Konijnen (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) / [redacted]	[redacted]	[redacted] % Matig [redacted] % Licht	

Aanvraagnummer:
AVD [REDACTED] 20171630

	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	[REDACTED]	[REDACTED] % Matig [REDACTED] % Licht	
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	[REDACTED]	[REDACTED] % Matig [REDACTED] % Licht	
	Cavia's (<i>Cavia porcellus</i>) /	[REDACTED]	[REDACTED] % Matig [REDACTED] % Licht	
	Kippen /	[REDACTED]	[REDACTED] % Matig [REDACTED] % Licht	

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 december 2022 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.

Gedurende de looptijd van de vergunning, koppelt de aanvrager aan de CCD terug welk soort vaccin tegen welke aandoening in welk type dierproef met wijze van uitvoering in welke diersoort en bijbehorend ongerief is uitgevoerd onder deze vergunning. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 31 januari door de CCD ontvangen zijn en rapporteert over het afgelopen kalenderjaar (1 januari - 31 december). Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Aanvraagnummer:

AVD [REDACTED] 20171630

Wanneer u overtuigend en onbetwistbaar kan aantonen dat er geen gegevens over de geteste stof kunnen worden vrijgegeven omdat de opdrachtgever deze als vertrouwelijke informatie heeft geclassificeerd kunt u deze informatie buiten de rapportage houden.

Mannelijke en vrouwelijke dieren moeten in evenredige aantallen gebruikt worden in Bijlagen Dierproeven 3.4.4.2 en 3.4.4.4, tenzij het onderzoek naar [REDACTED]. Indien gedurende het project blijkt dat er geslachts-specifieke effecten zijn, kunt u deze informatie als wijziging rapporteren aan de CCD. Deze informatie kan voor de CCD aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken.

Indien voor toelating tot landen buiten de Europese markt er meer dieren, meer ongerief of op andere wijze uitgebreider getest moet worden dan de Europese Farmacopee, moet in een wijziging worden aangegeven wat hierbij anders wordt uitgevoerd ten opzichte van de Europese regelgeving en waarom dit noodzakelijk is (welk land, welke voorschriften). Onderzoek strenger dan de Europese regelgeving mag dan ook alleen uitgevoerd worden na het indienen van een wijziging en de goedkeuring daarop.



Aanvraagnummer:
AVD [REDACTED] 20171630

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:

AVD [REDACTED] 20171630

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.

Levensloofdossier

Voor iedere hond, kat en niet-menselijke primate moet volgens artikel 15a van de wet een levensloofdossier bijgehouden worden.

Inventaris Wob-verzoek W17-12										
nr.	document NTS 20171646	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x			x		
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x		
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x						
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x						
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
8	Dec-advies				x		x	x		
9	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
10	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
11	Adviesnota CCD		x							x
12	Beschikking en vergunning				x		x	x		



Centrale Commissie Dierproeven

09 MEI 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 22000 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie Provimi BV Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [REDACTED] KvK-nummer 24131527 Straat en huisnummer [REDACTED] [REDACTED] Postbus [REDACTED] Postcode en plaats [REDACTED] [REDACTED] IBAN NL39RABO0300028598 Tenaamstelling van het rekeningnummer Provimi BV
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	(Titel) Naam en voorletters [REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. Functie Research Scientist Afdeling SMT R&D Telefoonnummer [REDACTED] E-mailadres [REDACTED]
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters [REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. Functie [REDACTED] Afdeling [REDACTED] Telefoonnummer [REDACTED] E-mailadres [REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters [REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. Functie [REDACTED] Afdeling [REDACTED] Telefoonnummer [REDACTED] E-mailadres [REDACTED]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 7 - 2017
- Einddatum 30 - 6 - 2022
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Screening of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Screening van voedingsstrategieën door middel van het gebruik van fysiologische parameters gericht op het verbeteren van darmgezondheid in varkens
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC Wageningen UR
- Postadres Postbus 9101
6700 HB Wageningen
- E-mailadres dec@wur.nl

4 Betaalgegevens

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

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

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

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

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats [REDACTED]

Datum [REDACTED]

Handtekening [REDACTED]



Form Project proposal

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

1 General information

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

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

The project 'Screening of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs' aims to identify nutritional solutions and/or additives that improve gut health of pigs throughout their life cycle. Nutritional solutions are developed based upon (1) identification

of ingredients and additives that improve pig performance through improved gut health, and (2) identification of physiological parameters (biomarkers) that give an indication of gut health and immune status of the pigs. The effects of nutritional solutions on gut health are expected to be better understood through the identification of biomarkers.

Gut health

Research in production animals is focusing more and more on maintaining gut health, with the ban on antibiotic growth promoters and general reduction of antibiotic usage being some of the main drivers. Gut health can be defined as "A steady state where the microbiome and the intestinal tract exist in symbiotic equilibrium and where the welfare and performance of the animal is not constrained by intestinal dysfunction" [1]. This definition combines the main factors determining gut health, which are diet, barrier function of the gastrointestinal tract (GIT) and balanced microbiota, together with effective digestion and absorption of feed, and effective immune status.

Most *in vivo* feed-intervention studies performed today measure standard performance parameters; feed intake, growth and general health status. This information is of importance, but it does not tell how functional components in the diet interact with the animal. Several studies indicate that dietary solutions directly or indirectly influence gut health. This is hypothesized to be happening through one or more of the following mechanisms: (1) feeding the cells of the immune system, (2) providing substrate for pathogens, (3) modifying the responses of leukocytes, (4) protecting against immunopathology, (5) influencing the microbiota composition of the gut, and (6) stimulating the immune system [2]. However, many questions still remain unanswered in this area. It appears that the detailed mechanisms and modes of action of intestinal structural and functional alterations first need to be better understood in order to develop new dietary solutions.

Relation between gut health and performance

Stress induced by environmental conditions or challenges by feed ingredients can influence gut health. At weaning, the young pig is challenged with separation from the sow, transportation, change of the diet and new pen mates, all of which may result in low voluntary feed intake, reduced performance and increased susceptibility to intestinal infections [3]. Additionally, the digestibility of feed is compromised just after weaning due to insufficient production of enzymes and sub optimal conditions for the enzymes to be fully activated. Because of the fast, right after weaning, a new microbial community is re-established in which Lactobacilli decrease considerably, whereas potentially pathogenic bacteria (e.g. Coliforms) increase [4]. This causes pigs to become more susceptible to overgrowth of potentially pathogenic bacteria such as *E. coli* [5]. Also intestinal morphology changes after weaning. The intestinal villi length has consistently been reported in literature to decrease, which is correlated with decreased feed intake post weaning [6].

Research to piglet performance post weaning used to be focused on the period after weaning, when the actual problems are occurring. However, it is becoming apparent that especially parturition and the immediate period after birth are important for microbial colonization of the gut and development of the GIT of the piglets [7]. Due to this development, research is expanding to the period before weaning, instead of only the period after weaning. This is including effect of sow nutrition during gestation and lactation on the piglets, and the effect of creep feed on the piglets.

Gut health is not only of relevance for young pigs, but also for finisher pigs. In finishers, a healthy gut can contribute to improved efficiency. Related to this is the interest in carry-over effect from nursery until finishing. Recent literature showed that dietary nursery treatments could affect performance in the later life of the pig [8]. This effect may be modulated by development of gut health in early life.

The use of biomarkers

This project is based on previous work that we performed within this area. We have already developed a chip that can measure microbiota in poultry. The microbiota detected on the chip were specifically identified as microbiota important for the health or growth of poultry. The database that was developed for poultry can be applied to create biomarkers for pigs to get more insight into the way nutrition is affecting gut health. This does not necessarily have to be done with microbiota data, but can also be

used for other gut health related biomarkers (e.g. cytokines, acute phase proteins). A different example of the work we have established so far in this area is the finding of a correlation between [REDACTED] and individual feed intake of weaned pigs. The use of such information can help us in the understanding of gut health by characterizing interactions between diet, structure and function of the GIT, microbiota, digestive function and immune status. In addition to that, we expect that ultimately these biomarkers can be applied for prediction of performance and detection of health issues, both in research setting and farm conditions.

The current project is different from other projects of parties working on the improvement of gut health in pigs, as research is not restricted to the post-weaning phase only. Other parties (companies and universities) and previous research have mainly focused on the period after weaning, when the main problems caused by impaired gut health are occurring. In our research facilities, we have the capability to monitor pigs in different life stages independently, but we can also follow them during later stages. In addition, we measure biomarkers not only as outcome parameter, but also with the aim to generate a robust database that can be used as model for prediction, detection and diagnosis of gut health and performance. Therefore, the current project contributes to the ongoing development of knowledge on gut health of pigs.

References:

1. Van der Aar, P.J., Molist, F., Van der Klis, J.D. (2016). The central role of intestinal health on the effect of feed additives on feed intake in swine and poultry. *Animal feed science and Technology*. *Accepted manuscript*.
2. Klasing, K.C. (2007). Nutrition and the immune system. *British Poultry Science* 48: 529-537.
3. Campbell, J.M., Crenshaw, J.D., Polo, J. (2013). The biological stress of early weaned piglets. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4 (19),
4. Heo, J., Opapeju, F., Pluske, J., Kim, J., Hampson, D., & Nyachoti, C. (2013). Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97, 207-237.
5. Pluske, J.R., Pethick, D., Hopwood, D., & Hampson, D. (2002). Nutritional influences on some major enteric bacterial diseases of pigs. *Nutrition Research Reviews*, 15, 333-371.
6. Pluske, J.R., Hampson, D.J., & Williams, I.H. (1997). Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science*, 51, 215-236.
7. Thompson, C.L., Wang, B., Holmes, A.J. (2008). The immediate environment during postnatal development has long-term impact on gut community structure in pigs. *The ISME Journal*, 2, 739-748.
8. Skinner, L.D., Levesque, C.L., Wey, D., Rudar, M., Zhu, J., Hooda, S., de Lange, C.F.M. (2014). Impact of nursery feeding program on subsequent growth performance, carcass quality, meat quality, and physical and chemical body composition of growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*, 92, 1044-1054.

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 project is to identify nutritional solutions and/or additives that improve gut health of pigs throughout their life cycle. Coinciding with evaluating growth performance, health will be reflected by identification of physiological parameters that function as biomarker for gut health and immune competence. The project is based on previous work within this area, in which a chip was developed that can measure microbiota (specifically those important for health and growth) of poultry.

The research group conducting the trials within this project has the appropriate expertise to guarantee the best outcome. The responsible applicant of the current project is a scientifically trained employee, actively conducting research since 2015. Next to the applicant, the project team consists of experts with

MSc or PhD degrees in relevant disciplines and experience in this specific research area.

3.3 Relevance

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

The major societal challenge addressed in this project is to work towards a socially accepted form of livestock production in the Netherlands by means of lowered antibiotics usage, lower impact on the environment, and improved animal health and welfare. Preventing the use of antibiotics is not only achieved by developing pre- and pro-biotic additives, but also by improving gut health of animals to make them less susceptible to pathogens.

Application and validation of new technologies and new uses of established technology (e.g. metabolomics, 16S sequencing, clinical blood markers) will make an important contribution to the understanding, prediction and control of immunological and physiological processes in swine.

3.4 Research strategy

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

The studies within this project aim to identify nutritional solutions and/or additives that improve gut health of pigs throughout their life cycle. The effects of nutritional solutions on gut health are expected to be better understood through the identification of biomarkers. Nutritional solutions and additives that will be studied include dose response studies for macro-nutrients, such as (fermentable) protein and fiber, to find optimal inclusion levels. Next, adequate feed intake before and after weaning is crucial for good gut health. Therefore, also nutritional interventions stimulating feed intake will be tested in the scope of this project. Examples can be the use of flavors, different physical feed forms and compounds affecting mineral balance. Lastly, new ingredients and additives that can positively influence nutrient uptake or (gut) health will be tested (e.g. probiotics, phytogenics and acidifiers).

Most research that studied the effect of nutritional solutions on swine gut health has been performed in the period right after weaning, because this is the period in which most problems occur related to impaired gut health. However, it is becoming more and more apparent that the period before weaning is crucial for development of the gut, and that early nutrition is affecting performance and health in the later life of the pig, up to slaughter. Therefore, in the current project we will consider the entire life span of the pig. This creates the need to perform animal studies mainly with nursery pigs, but also with sows, neonatal and finisher pigs, as well as combinations of these phases. In all of these trials, besides performance and general health, biomarkers will be investigated that are potentially associated with gut health and the quality of the immune response. This requires the collection of blood, tissue, faecal and urine samples.

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 main components of the project are:

1) Selection of nutritional compounds to be tested.

Literature and internal data will be reviewed in order to list possible candidates to be tested. A selection is made from this list, and the main selection criterion will be an improvement in performance through an improvement of gut health. However, we will also select solutions and/or additives of which no (relevant) in vivo data exists yet, but that do show interesting results in vitro. Next to that, solutions and/or additives may be selected based on a promising hypothesis of their effect on gut health.

2) Development of experimental program and animal trial execution.

The studies within this project aim to identify nutritional solutions and/or additives that improve gut health of pigs throughout their life cycle. The project mainly consists of studies evaluating the effect of nutritional solutions and/or additives on gut health of nursery pigs. However, of certain solutions it is hypothesized that they stimulate gastro-intestinal development of pigs already before weaning. These may be provided to the sow or the piglets themselves before weaning. Gut health of finisher pigs might also be modulated by providing them nutritional solutions during the finisher period. This requires feeding trials in the finisher phase as well, starting at ~25 kg body weight until approximately 115 kg. In these trials, nutritional solutions can be provided during the finisher phase, or carry-over effects of

treatments in earlier life can be investigated.

In our facilities, health status of the pigs is aimed to be at a high level. Based on literature and nursery studies executed in this project, we aim to identify nutritional solutions and/ or additives that will reduce infection or modulate gastrointestinal microbial response in pigs. Some of these compounds might be more beneficial to the gastrointestinal environment of pigs during a stressful event, such as a pathogen challenge. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection is one of the most important causes of post-weaning diarrhea in pigs. Therefore, *E. coli* challenge in nursery pigs will be selectively used in this project.

In these animal studies, several procedures will be performed to obtain information on the effect of the nutritional solutions and/ or additives on gut health of the pigs. Pigs will be weighed and their intake will be measured at several time points during the trial in order to conclude on effects on general performance. Additionally, several procedures will be part of this project: blood and tissue collection, individual housing, fecal and urinary collection via colostomy bags, feed deprivation for max 24 h and *E. coli* challenge. These procedures will only be performed in pigs after weaning, except for the blood and tissue collections. Blood and tissue collections can be performed in sows, pigs before and after weaning, and finisher pigs.

3) Evaluation of the effect of the different tested nutritional solutions and/or additives on gut health, and evaluation of relevance of biomarkers related to gut health.

This evaluation will result in recommendations on nutritional solutions / additives on the improvement of gut health in pigs. In parallel, the data that is being collected will be used in order to generate a database that can be used as model for prediction, detection and diagnosis of gut health and performance (comparable to the poultry microbiota chip).

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 starting point of this project, results of various nutritional intervention studies in nursery pigs will be compared with each other, as well as with relevant published research and our own previous work. Based on these results, dietary solutions will be identified that are hypothesized to improve gut health of pigs when provided to the sow, to the piglet pre and/ or post weaning, or to the pig in the finisher phase, resulting in improved performance. Next to this, literature and internal data will be reviewed to determine what biomarkers are already described as relevant in relation to gut health and pig performance.

An experimental program will be developed based on the nutritional solutions that are identified to improve gut health. Different types of trials will be part of this experimental program, with the aim to improve gut health of pigs, focusing on post-weaning problems. First, nursery pig studies will be conducted as this is the main period of interest. Then, additional studies will be performed with sows / pigs before weaning to determine whether additional improvement in gut health can be achieved by already providing nutritional solutions and / or additives before weaning. In addition, studies will be performed investigating the carry-over effect of nutritional solutions and / or additives provided in the nursery phase to the finisher phase. Moreover, based on these outcomes and literature review nutritional solutions and / or additives will be selected that are hypothesized to positively affect gut health of pigs in *E. coli* challenged conditions. These strategies will be tested in *E. coli* challenge trials in nursery pigs. Finally, trials will be performed in which we combine promising nutritional solutions and / or additives into one solution or into a feeding program.

Each study is considered a milestone. Results of studies will be used to optimize the power required to detect differences in physiological parameters based upon the selected treatments. During the course of the project, biomarkers will be identified that show to be the most explanatory for health and performance, and in further trials focus will be on these selected parameters. For each study that is part of this project, the animal welfare body (AWB) will be consulted to discuss the proposed study design and how this relates to previous studies.

Nutritional solutions and / or additives are considered to be successful when we can show in our trials that they improve pig performance through improved gut health. Outcome parameters thus include performance, and the biomarkers we identify as being good indicators of gut health. These solutions might be combined in a package to be provided in the same period, or in different following periods (program). In parallel, the data that is being collected will be used in order to generate a database that can be used as model for prediction, detection and diagnosis of pig gut health and performance.

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	Nursery pig studies
2	Blood and tissue collection studies
3	<i>E. coli</i> challenge nursery pigs
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	22000	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Provimi BV	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		1	Nursery pig studies

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The aim of this project is to identify nutritional solutions and / or additives that improve gut health of pigs throughout their life cycle. Coinciding with evaluating growth performance, health will be reflected by identification of physiological parameters that may function as biomarker for gut health and immune competence. The project is based on previous work within this area, in which a chip was developed that can measure microbiota (specifically those important for health and growth) of poultry.

An experimental program will be developed based on the nutritional solutions and / or additives that are identified to improve gut health. Different types of trials will be part of this experimental program, with the focus on improving gut health of nursery pigs to prevent post-weaning problems. This objective requires the execution of feeding trials with pigs after weaning. Most *in vivo* feed-intervention studies performed today measure standard performance parameters; feed intake, growth and general health status (i.e. mortality and removal). This information is of importance, but it does not tell how functional components in the diet interact with the animal. Several studies indicate that dietary solutions directly or indirectly influence gut health, but many questions still remain unanswered in this area. It appears that the detailed mechanisms and modes of action of intestinal structural and functional alterations first need to be better understood in order to develop new dietary solutions.

In addition, the aim of this project is to generate a database that can be used as model for prediction, detection and diagnosis of gut health and performance. This can be done with any gut health related biomarkers (e.g. microbiota, cytokines, acute phase proteins). The use of such information can help us in the understanding of gut health by characterizing interactions between diet, structure and function of the GIT, microbiota, digestive function and immune status. In addition to that, we expect that ultimately

these biomarkers can be applied for prediction of performance and health issues, both in research setting and on farm. This requires the development of an experimental program that contains additional measurements besides performance.

General experimental design

Dietary treatments are usually provided from the moment the pigs enter the facility, which is at weaning. Nutritional solutions and additives that will be studied include dose response studies for macro-nutrients, such as (fermentable) protein and fiber, to find optimal inclusion levels. Next, adequate feed intake before and after weaning is crucial for good gut health. Therefore, nutritional interventions stimulating feed intake will be tested in the scope of this project. Examples can be the use of flavors, different physical feed forms and compounds affecting mineral balance. Lastly, new ingredients and additives that can positively influence nutrient uptake or (gut) health will be tested (e.g. probiotics, phytochemicals and acidifiers).

Nursery trials normally end at 6 / 7 weeks post weaning but may end at a younger age. Body weight of the pigs is measured at weaning, at several time points during the trial and at the end of the trial period. In addition, feed intake is measured at these time points. Because the pigs are group housed, this is an average for the pen. This information is of importance, but it does not tell how functional components in the diet interact with the animal. Therefore, additional measurements are required. This includes blood collection, tissue collection, clean feces or urine collection by colostomy bags, or individual feed intake (which requires individual housing). In addition, pigs may be deprived from feed (max 24 h) because of specific blood parameters that are influenced by feeding status or as model to mimic post-weaning feed intake depression. Each of these measurements is further described in the following sections.

Outcome parameters in which the effects of nutritional solutions / additives will be assessed are:

- Growth performance
 - o Body weight gain
 - o Feed intake (pen average or individual)
 - o Feed efficiency (pen average or individual)
- Stool quality
- Blood parameters for e.g.:
 - o Immune competency
 - o Clinical chemistry
 - o Antioxidant activity
- Dissection for e.g.:
 - o Immune competency
 - o Microbiota status
 - o Histology
- Urine / feces collection for e.g.:
 - o Digestibility
 - o Mineral balance

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

Depending on the nutritional solutions / additives studied, (a combination of) the following procedures will be applied:

Blood collection

Blood collections are mainly required in trials where we are interested in immune and clinical parameters, and antioxidant status of the pigs. To be able to measure differences in physiological parameters over time, it is necessary to take blood samples at multiple time points during the trial, preferably from the same pig each time point. The exact time points depend on the specific research questions of the trial. Blood will be collected at a maximum of eight time points per pig during the trial. There will be a minimum of 24 hours between two consecutive blood collections from the same pig.

Tissue collection

Gut morphology is a major contributor to gut health. In certain trials, we are interested in the effect of a nutritional solution on morphology, and therefore it is required to collect tissue samples after the pig has been killed.

Feed deprivation

In trials in which we want to mimic post-weaning feed intake depression, or in which we need to take blood samples to analyze specific blood parameters that are influenced by feeding status, it may be necessary to deprive the pigs from feed for a certain time period (a maximum of 24h). Water is always provided ad libitum.

Individual housing

Individual housing of pigs is not standard, but depends on the nutritional solutions and / or additives studied in the specific trial. During such a trial, pigs will be housed in pairs within the pens, and during the period of individual housing, this pen will be split in two. The housing system enables these pigs to still have visual, olfactory and acoustic contact. Pen size of individually housed pigs is 0.75m².

If possible, we will limit the period of individual housing to 24 hours. This is the case for studies in which we obtain information on digestibility or mineral balance. In these studies, colostomy bags will be used in order to collect the feces or urine quantitatively and uncontaminated. Individual housing is required to prevent the pigs from detaching each other's bags. Pigs will only be housed individually for the period needed to take the samples.

The main reason for individual housing, however, is to determine relations between individual feed intake and biomarkers. This is important within this project because it is well-known that feed intake of pigs can be highly variable, especially in the period just after weaning, and is directly affecting gut health. In this case, a period of 24 hours of individual housing will not be sufficient, but it will be limited to a maximum of 5 days. A period of 5 days enables us to determine a reliable average daily feed intake of the individual pigs. Feed intake is correlated to piglet gain, which we measure at pig level; however, especially in the first days post weaning this correlation is low. In addition, we have previous proof of a biomarker [REDACTED] that is correlated to feed intake, but not to gain of pigs. This finding showed us that by having individual animal data we could create a database with higher variability than would be the case for group-housed pigs, resulting in a more robust model for detection and prediction. Gain can be negative depending on feed intake and / or health, but feed intake will always be positive.

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

Over the course of this project, it is expected to find 30-40 possible nutritional strategies modulating gut health of weaned pigs, leading to a maximum of 160 treatments that need to be tested within the course of this project (including control treatments). In all of these trials, blood will be collected from the pigs; however, only in part of these trials, tissue samples will be collected or pigs are deprived from feed or individually housed.

For each trial, a power analysis will be performed based on the main blood parameter measured in the trial to determine the number of pigs required. It is estimated that, based on our power analysis on performance, and experience with analysis of blood parameters, a maximum of 12 replications per treatment will be required. Pen is experimental unit, however, for blood and tissue collections, one pig per pen will be randomly selected to represent the pen.

In addition to this, next to blood analyses, performance will also be an important outcome parameter. By the nutritional strategies we select, we expect to influence both intake and gain by improving gut health. We expect a change of approximately 5-10% gain, based on literature and experience. Therefore, we want to detect a difference of at least 5% between treatments. Using power calculations based on historical data, an LSD of 5% for gain requires 10 replications per treatment with six pigs per pen.

B. The animals

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

The animals used in the current project are from a commercial line. Weaning occurs between 21-30 days of age, and both gilts and barrows are used. Studies will last for a maximum of 7 weeks post weaning.

We expect to study 32 treatments each year with group housed pigs, leading to a maximum of 384 nursery pigs required each year for blood collections (1920 pigs for the total project). Depending on the required outcome parameters of the trial, dissection will be performed on part of these pigs to obtain tissue samples.

In addition, we expect to study six treatments per year for which we need to deprive pigs from feed (for 24h). These pigs are housed with six pigs per pen (pen is experimental unit), leading to a maximum of 432 (treatments with 12 pens and 6 pigs per pen) nursery pigs required each year (2160 pigs for the total project). Finally, we expect to study a maximum of 12 treatments per year for which we need to house pigs individually. These pigs are housed in pairs for most of the trial, thus taking pair of pigs as experimental unit, leading to a maximum of 288 pigs required each year (1440 pigs for the total project, 50% max. 24 hours and 50% max. 5 days). We expect that blood will be collected from all of these individually housed pigs. This means the total number of animals requested for the duration of the project is 5520 (=1920+2160+1440). We expect that 15% (828) of these pigs will be killed in order to take tissue samples.

No genetically modified animals will be used.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

Yes, it is possible that pigs used in these studies were already involved in neonatal pig studies, in which blood was collected from the pigs (at a maximum of 6 time points before weaning). However, it is not expected that the cumulative discomfort will be increased from mild to moderate because of re-use with this type of procedures.

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

To study the consequences of nutritional solutions and / or additives post-weaning on gut health of the pig, it is necessary to use weaned pigs.

Replacement is not possible. The reaction of an animal to nutritional interventions and / or additives is multifactorial and includes a variety of physiological changes. It is not possible to study these effects with alternative techniques.

Reduction is applied by conducting power calculations to determine the minimum number of replications required to significantly demonstrate the desired difference in growth performance, as well as in gut health parameters. The power calculations are based on historical internal data and data that will be gathered during the course of this project in order to reduce the number of animals involved where possible.

Refinement will be applied during blood collection when only a small quantity of blood is needed. If this is the case, a drop of blood will be collected from the ear instead of from a jugular vein. In the case of individual housing, pigs will be housed individually as short as possible to obtain the trial objectives. In addition, pigs are able to have visual, olfactory and acoustic contact with other pigs at all time. In addition, one toy per pen is provided to all pigs as distraction material. This toy is changed regularly.

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

Measures taken to reduce risk of pain, suffering and distress are focused on the strict enforcement of the monitoring of the welfare of animals two times per day, by means of a visual check. The procedures as part of this project are not expected to lead to any humane endpoints, however, in case of any issues related to welfare and health of the animals, measures will be taken. These measures include, depending on the specific situation; taking animals out of trial, providing them with medication, or euthanization if there is no alternative.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

A literature review has been conducted (and will be conducted at various stages of the project), which identified that despite all the ongoing research in this area, nutritional solutions and / or additives are still lacking in consistently improving gut health in pigs. In addition, interviews with knowledgeable people in the commercial swine industry have been done to further specify our aim.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

The housing and care of the animals used in the current experiment are in accordance with the Directive 2010/63/ EU, except for the absence of bedding material for group-housed pigs. Group-housed pigs will not be provided with bedding material to prevent accumulation of faeces in the pen. Accumulation of faeces may cause an unhygienic and uncomfortable environment for the pigs. One toy per pen is provided to the pigs as distraction material, which is changed regularly.

In some instances, pigs will be housed individually for a maximum of 5 days. Due to our housing system, individually housed pigs will have a pen surface of 0.75m², which is below the requirements by the Directive 2010/63/EU. Pigs that are housed individually or in pairs will be provided with rubber mats to increase their comfort.

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.

Blood collection might result in pain, but it only takes a short period and the pain will be limited to this period. Other procedures do not result in 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 in pens of group-housed pigs

Explain why these effects may emerge.

Group-housed pigs will not be provided with bedding material. Pigs are housed under practical conditions at our facility to facilitate application of our solutions in the field. Potentially edible bedding material (e.g. straw, sawdust) is not preferred to be used in feeding trials. A rubber mat could be provided as bedding material, however, its use with heavier pigs will leave little space for the manure drainage. This will result in more dirty pens than normal, increasing disease pressure.

According to Dutch housing legislation, weaned pigs are not required to be provided with partly closed floor, provided that the floor is not made from concrete. All our facilities meet these requirements. We do not expect that the pigs will experience additional discomfort through our experiments. Individually housed pigs will be provided with rubber mats.

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

Pigs that are housed individually or in pairs will receive rubber mats. In pens that are not partly closed, floors are not made from concrete.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

The animal procedures applied in this study (including blood collection, tissue collection, feed deprivation, individual housing (max. 24h), and/or colostomy bags) will result in a mild classification of the expected cumulative discomfort. There is an exception for the pigs that are individually housed for a period longer than 24 hours. This will result in moderate discomfort for 720 pigs.

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.

Part of the animals will be euthanized in order to collect tissue samples (15% of all pigs).

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'.	22000	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Provimi BV	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	2	Blood and tissue collection studies

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The aim of this project is to identify nutritional solutions and / or additives that improve gut health of pigs throughout their life cycle. Coinciding with evaluating growth performance, health will be reflected by identification of physiological parameters that may function as biomarker for gut health and immune competence. The project is based on previous work within this area, in which a chip was developed that can measure microbiota (specifically those important for health and growth) of poultry.

An experimental program will be developed based on the nutritional solutions and / or additives that are identified to improve gut health. Different types of trials will be part of this experimental program, with the focus on improving gut health of nursery pigs to prevent post-weaning problems. However, it is becoming apparent that especially parturition and the immediate period after birth are important for microbial colonization of the gut and development of the GIT of the piglets. Due to this development, research is expanding to the period before weaning, instead of only the period after weaning. This is including effect of sow nutrition during gestation and lactation on the piglets, and the effect of creep feed on the piglets. In this type of studies, it is important to take blood samples from neonatal piglets and / or sows, to be able to measure the effect of the nutritional solutions on the development of the pig's gut.

In addition, what happens during the nursery period of the pig will most likely have effects in later life. Therefore, we want to follow-up finisher pigs to determine if the nutritional solution they received in the weaner phase is affecting later performance. Another possibility is to test nutritional solutions of which we expect to improve gut health during the finisher period. Performance parameters are measured during the trial period, which is of importance, but it does not tell how functional components in the diet interact with the animal. Therefore, trials require additional measurements. By taking blood samples, we

will be able to obtain information on e.g. immune competency and clinical chemistry. Tissue samples can provide us with more knowledge on gut morphology, which is a major contributor to gut health.

General experimental design

Dietary treatments will either be provided to the sow, to study transgenerational effect on gut health, or to the pigs before weaning or during the finisher phase to determine direct effects on gut health. Nutritional solutions and additives that will be studied include dose response studies for macro-nutrients, such as protein and fiber, to find optimal inclusion levels. Next, adequate feed intake before weaning is crucial for good gut health and to stimulate feed intake after weaning. Therefore, also nutritional interventions stimulating feed intake will be tested in the scope of this project. Examples can be the use of flavors and different physical feed forms and compounds. Lastly, new ingredients and additives that can positively influence nutrient uptake or (gut) health in either neonatal or finisher pigs will be tested (e.g. probiotics, phytogenics and acidifiers).

Body weight of the pigs is measured at the start of the trial period, at several time points during the trial and at the end of the trial period. In addition, feed intake is measured at these time points. Because the pigs are group housed, this is an average for the pen (in the case of neonatal and finisher pigs). This information is of importance, but it does not tell how functional components in the diet interact with the animal. Therefore, additional measurements are required. This includes blood and tissue collection. These measurements are further described in the following sections.

Outcome parameters in which the effects of the nutritional solutions and / or additives will be assessed, are:

- Growth performance:
 - o Body weight gain
 - o Feed intake
 - o Feed efficiency
- Blood parameters for e.g.:
 - o Immune competency
 - o Clinical chemistry
 - o Antioxidant activity
- Dissection for e.g.:
 - o Immune competency
 - o Microbiota status
 - o Histology

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

Depending on the nutritional solutions / additives studied, (a combination of) the following procedures will be applied:

Blood collection

To be able to measure differences in physiological parameters over time, it is necessary to take blood samples at multiple time points during the trial, preferably from the same pig each time point. The exact time points depend on the specific research questions of the trial. Blood will be collected at a maximum of six time points per pig during the trial. There will be a minimum of 24 hours between two consecutive blood collections from the same pig.

Tissue collection

In certain trials, we are interested in the effect of a nutritional solution on morphology, and therefore it is required to collect tissue samples after the pig has been killed.

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

Over the course of this project, it is expected to find several interesting nutritional strategies

hypothesized to modulate gut health related to finisher pigs as well as to sows and piglets pre-weaning, leading to a maximum of eight treatments (including controls) to be tested in both finisher pigs and sows / neonatal pigs each year.

The number of sows / piglets per litter required for blood sampling depends on the blood parameter of interest, thus a power analysis will be performed before each trial. The same procedure will be applied for finisher pigs in order to determine total number of pigs needed.

B. The animals

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

The animals used in the current project are from a commercial line. Both (lactating) sows and neonatal pigs (gilts and boars / barrows) are included in this procedure. In addition, finisher pigs will be used in trials that last until the pigs have achieved an average body weight of 120 kg. After, they are sent to a common slaughterhouse.

It is estimated that a maximum of 480 sows, 1440 piglets pre-weaning and 480 finisher pigs will be necessary for the project. The total number of animals requested for the duration of the project is 2400. We expect that 10% of these pigs will be killed for tissue collection.

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.

Yes, it is possible that carry-over effects of the nutritional solutions provided in the nursery study will be measured in a consecutive finisher pig trial. In addition, it is possible that a finisher pig trial in which blood needs to be collected, will follow up on a nursery trial in which blood was collected from the piglets. However, this is not expected to occur in more than one trial per year due to the limited number of finisher pig trials in which blood will be collected. In addition, blood can be sampled from sows that have been sampled in previous trials. Cumulative discomfort will not be increased from mild to moderate because of re-use with this type of procedures (blood will be collected for a maximum of 14 times in total; 8 times in nursery and 6 times in neonatal or finisher pigs).

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

To study the consequences of nutritional solutions and additives on gut health of the pig, it is necessary to use pigs.

Replacement is not possible, as alternative techniques are limited. The reaction of an animal to nutritional interventions is multifactorial and includes a variety of individual specific reactions including hormonal, behavioral and physiological changes. It is not possible to study these effects with alternative techniques.

Reduction is applied by conducting power calculations to determine the minimum number of replications required to significantly demonstrate the desired difference in physiological parameters, as well as growth. The power calculations are based on historical internal data and data that is gathered during the course of this project.

Refinement will be applied during blood collection when only a small quantity of blood is needed. If this is the case, a drop of blood will be collected from the ear instead of from a jugular vein. In addition, one

toy per pen is provided to all pigs as distraction material. This toy is changed regularly.

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

Measures taken to reduce risk of pain, suffering and distress are focused on the strict enforcement of the monitoring of the welfare of animals two times per day, by means of a visual check. The procedures as part of this project are not expected to lead to any humane endpoints, however, in case of any issues related to welfare and health of the animals, measures will be taken. These measures include, depending on the specific situation; taking animals out of trial, providing them with medication, or euthanization if there is no alternative.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

A literature review has been conducted (and will be conducted at various stages of the project), which identified that despite all the ongoing research in this area, nutritional solutions and / or additives are still lacking in consistently improving gut health in pigs. In addition, interviews with knowledgeable people in the commercial swine industry have been done to further specify our aim.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

The housing and care of the animals used in the current experiment are in accordance with the Directive 2010/63/ EU, except for the absence of bedding material. Pigs will not be provided with bedding material (rubber mats) to prevent accumulation of faeces. Accumulation of faeces may cause an unhygienic and uncomfortable environment for the pigs. One toy per pen/ farrowing crate is provided to the pigs/ sows as distraction material, which is changed regularly.

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.

Blood collection might result in pain, but it only takes a short period and the pain will be limited to this period.

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

Explain why these effects may emerge.

Pigs will not be provided with bedding material. Pigs are housed under practical conditions at our facility to facilitate application of our solutions in the field. Potentially edible bedding material (e.g. straw, sawdust) is not preferred to be used in feeding trials. A rubber mat could be provided as bedding material, however, its use with heavier pigs will leave little space for the manure drainage (since already <40% of the pen is concrete floor). This will result in more dirty pens than normal, increasing disease pressure.

According Dutch housing legislation, lactating sows are not required to be provided with partly closed floor, provided that the floor is not made from concrete. Finisher pigs and gestating sows are required to be provided with partly closed floor (<40%). All our facilities meet these requirements. We do not expect that the pigs will receive additional discomfort through our experiments.

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

Pens of the finisher pigs and gestating sows contain partly concrete floors (<40%). Floors in pens of lactating sows are not concrete.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Indicate the likely incidence.

K. Classification of severity of procedures

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

The animal procedures that will be applied in this study include blood and tissue collection. This results in a mild classification of the expected cumulative discomfort.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Part of the pigs (10%) will be euthanized in order to collect tissue samples.

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'.	22000	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Provimi BV	
1.3	List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
		3	<i>E. coli</i> challenge nursery pigs

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The aim of this project is to identify nutritional solutions and / or additives that improve gut health of pigs throughout their life cycle. Coinciding with evaluating growth performance, health will be reflected by identification of physiological parameters that may function as biomarker for gut health and immune competence. The project is based on previous work within this area, in which a chip was developed that can measure microbiota (specifically those important for health and growth) of poultry.

Based on literature and nursery studies executed in this project, we aim to identify nutritional solutions and / or additives that will reduce infection or modulate gastrointestinal microbial response in pigs. Some of these compounds might be more beneficial to the gastro-intestinal environment of pigs during a stressful event, such as a pathogen challenge. Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection is one of the most important causes of post-weaning diarrhea in pigs. Therefore, *E. coli* challenge in nursery pigs will be selectively used in this project.

General experimental design

Dietary treatments are usually provided from the moment the pigs enter the facility, which is at weaning. Nutritional solutions and additives that will be studied include dose response studies for macro-nutrients, such as (fermentable) protein and fiber, to find optimal inclusion levels. Next to that, new ingredients and additives that are hypothesized to reduce infection or modulate gastrointestinal microbiota in pigs under pathogen challenge will be tested (e.g. probiotics, phytogenics and acidifiers).

E. coli challenge trials normally end at 3 or 4 weeks post weaning but may also end at a younger age. Pigs will be provided the *E. coli* challenge between 0 and 8 days post weaning. Body weight of the pigs is

measured at weaning, at several time points during the trial and at the end of the trial period. Feed intake is measured at these time points. Because the pigs are housed in pairs, this is an average for the pen. This performance data is of importance, but it does not tell how functional components in the diet interact with the animal. Therefore, additional measurements are required. This includes blood and tissue collection. Each of these measurements is further described in the following sections.

Outcome parameters in which the effects of the nutritional solutions and / or additives will be assessed, are:

- Growth performance
 - o Body weight gain
 - o Feed intake (pair average)
 - o Feed efficiency (pair average)
- Stool quality
- Mortality / morbidity
- Blood parameters for e.g.:
 - o Immune competency
 - o Clinical chemistry
 - o Antioxidant activity
- Dissection for e.g.:
 - o Immune competency
 - o Microbiota status
 - o *E. coli* counts

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

At weaning, pigs are allocated to their treatments. Pigs will be raised for 3 to 4 weeks, housed with two pigs per pen, comparing two oral challenges (placebo or infected). Between 0 and 8 days post weaning, all pigs part of the *E. coli* challenge will be orally inoculated with *E. coli*. Control pigs will receive a 'scam' oral inoculation, to simulate the level of stress caused by the inoculation itself, without providing the pigs with the actual *E. coli*. During the trial, piglets are weighed, and faeces is scored at several time points. In addition, rectal temperature of the pigs is monitored twice per day during the first week after inoculation. At several time points during the trial, blood samples are collected. At the end of the trial, all pigs are euthanized in order to collect tissue samples.

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

Over the course of this project, it is expected to find several interesting nutritional strategies that we want to test in the nursery period under a controlled *E. coli* challenge. In all of these trials, part of the pigs will be challenged with *E. coli*, and blood and tissue samples need to be collected.

A power analysis will be performed before each trial to determine the required number of pigs.

B. The animals

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

The animals used in the current project are from a commercial line. Weaning occurs at a range of 21-30 days of age and both gilts and barrows are used in all studies. A study will last for a maximum of 4 weeks.

It is estimated that, based on our own experience with this method, and literature, a maximum of 12 replications per treatment will be required. Pigs will be housed in pairs. We expect to study six treatments each year, leading to a maximum of 144 nursery pigs required each year for *E. coli* challenge. The total number of animals requested for the duration of the project is 720.

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.

Yes, it is possible that pigs used in these studies were already involved in neonatal pig studies (blood collections). However, it is not expected that the cumulative discomfort will be increased from moderate to severe because of re-use with this type of procedures.

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

To study the consequences of nutritional treatments on performance and physiological parameters of the pig in *E. coli* challenge conditions, it is necessary to make use of the target animal.

Replacement is not possible, as alternative techniques are limited. Weaning has a major impact on the physiology of the pig, which is not possible to simulate with e.g. *in vitro* models.

Reduction is applied by conducting power calculations to determine the minimum number of replications required to significantly demonstrate the desired difference in growth performance, as well as in physiological parameters. The power calculations are based on historical internal data and data that is gathered during the course of this project. Pigs will not be housed with six pigs per pen, as we usually do in our nursery trials, but in pairs. This will reduce the number of pigs required for the *E. coli* challenge.

Refinement will be applied during blood collection when only a small quantity of blood is needed. If this is the case, a drop of blood will be collected from the ear instead of from a jugular vein. In addition, pigs will not be housed individually but in pairs. This will enable them to express better their social behaviour and consequently reduce post-weaning stress.

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

Measures taken to reduce risk of pain, suffering and distress are focused on the strict enforcement of the monitoring of the welfare of animals two times per day, by means of a visual check. Furthermore, possibilities for humane endpoints have been defined.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

A literature review has been conducted (and will be conducted at various stages of the project), which identified that despite all the ongoing research in this area, nutritional solutions and / or additives are still lacking in consistently improving gut health in pigs. In addition, interviews with knowledgeable people in the commercial swine industry have been done to further specify our aim.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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.

Blood collection might result in pain, but it only takes a short period and the pain will be limited to this period. In addition, pigs will likely experience *E. coli* symptoms, including fever, which may result in pain. *However, these symptoms are part of the E. coli challenge model. The use of pain relieving methods might therefore influence trial results.*

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?

Symptoms of *E. coli* infection

Explain why these effects may emerge.

Pigs will be inoculated with *E. coli* and therefore it is very likely that they will experience *E. coli* symptoms, including fever and diarrhoea.

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

Pigs will be monitored closely to determine severity of *E. coli* symptoms. Humane endpoints are identified as described in the following section.

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.

Pigs are checked twice a day so we can detect discomfort, and act accordingly in time. Humane endpoints will be applied when one of the following conditions is occurring:

- Dehydration (combination of the following signs: watery diarrhoea, lethargy, rough hair, sunken belly and eyes)

- Temperature > 40.5 °C for three consecutive observation moments
- Reduction in body weight more than 10% over a 3 day period
- Bloody diarrhoea

Indicate the likely incidence.

Based on previous experience it is estimated that not more than 10% of the pigs will reach a humane endpoint

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 *E. coli* challenge model will result in a:

Moderate level of discomfort in 80% of the pigs: Based on previous experience and literature, proposed infection model will be able to mimic conditions of an *E.coli* infection where growth performance will be affected, but with mortality at a maximum of 10% per round. Discomfort will be caused by most likely diarrhoea, low feed intake and gain, and possibly limited mortality. In addition, blood and tissue samples will be collected from these pigs.

Mild level of discomfort in the other 20% of the pigs: These pigs receive the placebo challenge (scam inoculation). In order to take the blood samples, the pig is fixated for the time required to take the blood sample. These pigs will also be euthanized for sample collection.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

The animals will be euthanized in order to collect tissue samples.

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

Provimi BV



**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
AVD2200020171646

Bijlagen

2

Datum 3 mei 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 3 mei 2017. Het gaat om uw project "Screening of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD2200020171646. 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:

3 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD2200020171646

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
3 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD2200020171646

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 22000
Naam instelling of organisatie: Provimi BV
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 24131527
Straat en huisnummer: [REDACTED]
Postcode en plaats: [REDACTED]
IBAN: NL39RABO0300028598
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Provimi BV

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]
Functie: Research Scientist
Afdeling: SMT R&D
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:

3 mei 2017

Aanvraagnummer:

AP0200020171646

Over uw project

Geplande startdatum:

1 juli 2017

Geplande einddatum:

30 juni 2022

Titel project:

Screening of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs

Titel niet-technische samenvatting:

Screening van voedingsstrategieën door middel van het gebruik van fysiologische parameters gericht op het verbeteren van darmgezondheid in varkens

Naam DEC:

DEC Wageningen UR

Postadres DEC:

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen (HP 231)

E-mailadres DEC:

dec@wur.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen:

€ 1.541,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam:

[Redacted]

Functie:

[Redacted]

Plaats:

[Redacted]

Datum:

3 mei 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Provimi BV



**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
AVD2200020171646

Bijlagen

2

Datum 3 mei 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 3 mei 2017

Vervaldatum: 2 juni 2017

Factuurnummer: 171646

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD2200020171646	€ 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.

DEC WUR 13 juni 2017

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD2200020171646**
2. Titel van het project: Screening of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs
3. Titel van de NTS: Screening van voedingsstrategieën door middel van het gebruik van fysiologische parameters gericht op het verbeteren van darmgezondheid in varkens
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
[REDACTED]
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: 03-05-2017
Aanvraag compleet: ja
In vergadering besproken: 15-05-2017
Anderszins behandeld:
Termijnonderbreking(en) van 16-05-2017 tot 29-05-2017 en van 06-06-2017 tot 09-06-2017 en van 12-06 tot 13-06-2017
Besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen: n.v.t.
Aanpassing aanvraag: 29-05-2017, 09-06-2017 en 13-06-2017
Advies aan CCD: 13-06-2017
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: 16-05-2017
Datum antwoord: 29-05-2017, 09-06-2017 en 13-06-2017
Gestelde vragen en antwoorden:
M.b.t. het projectvoorstel:
De DEC verzoekt u een uitgebreidere toelichting te geven op het proces dat leidt tot de keuze van de toe te dienen stoffen en een indicatie te geven van de selectiecriteria (op hoofdlijnen) die hierbij zullen worden gehanteerd.
Er is nadere toelichting toegevoegd in het projectvoorstel onder 3.4.2. D.m.v. een literatuurstudie en studie van voorgaande interne proeven zal een lijst worden samengesteld van mogelijke kandidaten om getest te worden binnen dit project. Van deze producten en/of concepten wordt een selectie gemaakt, met als belangrijkste criterium een verbetering in groei d.m.v. verbeterde darmgezondheid. Daarnaast zullen we ook producten en/of concepten selecteren waar nog geen (relevante) in vivo data beschikbaar van is, maar waarvan interessante resultaten in vitro zijn gevonden. Ook zullen producten en/of concepten geselecteerd worden waarvan nog geen in vivo of in vitro data beschikbaar is, maar waarvan de hypothese veelbelovend is m.b.t. het positieve effect op darmgezondheid.
M.b.t. de appendices:
U verwijst in de laatste alinea van D. naar "guidelines as described in the study protocol with respect to monitoring the welfare of animals throughout the study". Het is de DEC niet duidelijk welke guidelines en welk study protocol hiermee worden bedoeld en zij verzoekt u dit te verhelderen.
Deze paragraaf is anders verwoord in de drie appendices om meer duidelijkheid te creëren.

De DEC verzoekt u in appendix 1 en 2 bij F. (accommodation and care) toe te voegen welke kooiverrijking wordt toegepast en dit ook te vermelden bij D. (verfijning). Tevens verzoekt ze u bij appendix 2 uitgebreider te beargumenteren waarom er geen rubberen matten worden gebruikt, aangezien rubberen matten in de ogen van de DEC even goed schoon te houden zijn als een andere ondergrond.

Per hok wordt een speeltje verstrekt, dat regelmatig wordt verwisseld. Dit is toegevoegd in beide appendices bij F. en D.

Een uitgebreidere argumentatie is toegevoegd bij appendix 2, onderdeel I. De dieren worden onder praktijkomstandigheden gehuisvest, om toepassing in de praktijk te faciliteren. Het verstrekken van mogelijk eetbaar ondergrond materiaal is niet wenselijk in voerproeven. Rubberen matten zouden als ondergrond materiaal verstrekt kunnen worden, echter, bij de zwaardere biggen en vleesvarkens zal het gebruik van een rubberen mat weinig ruimte overlaten waar de mest nog door het rooster kan, hierdoor wordt het hok snel vies wat de infectiedruk verhoogt. We verwachten dat bij gebruik van een kleinere mat, de varkens eerder gaan vechten om een plek op de mat. Dit kan de stress van de dieren verhogen en daarmee het welzijn verminderen.

De DEC heeft naar aanleiding van uw beantwoording van haar vragen nog een aanvullende vraag. U geeft aan, dat de varkens onder praktijkomstandigheden worden gehouden. Onder praktijkomstandigheden mogen dieren echter alleen op roosters gehuisvest worden mits minimaal 40 % bestaat uit een dichte vloer

(<http://www.rvo.nl/onderwerpen/agrarisch-ondernemen/dieren/dierenwelzijn/welzijnseisen-voor-dieren/varkens>), <http://www.ikbnederland.nl/wp-content/uploads/Bijlage-3j-Overzicht-welzijnseisen-voor-varkens.pdf> , zie punt 11 en punt 17 in dit artikel). U geeft ook aan dat de varkens allemaal op een dichte vloer/mat willen liggen. Het is aan u als onderzoeker om de ruimte zo in te richten, binnen de wettelijke regels, dat het welzijn niet geschaad wordt en de proeven niet meer ongerief geven dan de varkens zouden ondervinden onder praktijkomstandigheden.

Als door de experimenten varkens zich onwel kunnen voelen, zullen ze meer gaan liggen en hebben ze extra behoefte aan een warme, droge ligplaats. Als u problemen voorziet met natte hokken of vechten om een dichte ligplaats op een mat, zou het wellicht meer voor de hand liggen om de dichte ligruimte te vergroten zodat alle dieren een dicht stuk vloer hebben om te liggen. Als dieren gaan vechten om allemaal op de mat te gaan liggen, hebben ze kennelijk behoefte aan een warme, zachte ondergrond. De DEC verzoekt u een oplossing hiervoor te zoeken d.m.v. vergroting van het vloeroppervlak.

We hebben over onderstaande contact gehad met onze adviseur op het gebied van stalrichting [REDACTED] en hij gaf aan dat de beschikbare vloer van een stal wel geheel uit roostervloer bestaan als de vloer bestemd is voor gespeende biggen of zogende zeugen met biggen. Echter mag de roostervloer dan niet vervaardigd zijn van beton. Onze roostervloeren van de gespeende biggen en zogende zeugen met biggen zijn van kunststof, dus in dat geval voldoen wij aan deze eisen voor praktijkomstandigheden. Zie ook deze link (Artikel 2.18. Vloeren) <http://wetten.overheid.nl/BWBR0035217/2017-01-01#Hoofdstuk2> : De voor de varkens beschikbare vloer van een stal bestaat niet geheel uit roostervloer, tenzij de vloer is bestemd voor gespeende varkens of zogende zeugen met biggen en niet is vervaardigd van beton.

Vloeren van onze vleesvarkens en dragende zeugen bestaan wel voor minimaal 40% uit dichte vloer, dus hier voldoen wij ook aan de eisen van praktijkomstandigheden.

Daarnaast verwachten wij dat door onze experimenten de varkens geen extra ongerief zullen ondervinden en dat we daarom geen extra ligcomfort hoeven te verstrekken.

Uitzondering hierop zijn de proeven waarin de biggen een E. coli challenge ondervinden en de proeven waarin de biggen individueel gehuisvest worden. In deze gevallen verstrekken wij een rubberen mat voor extra ligcomfort. Dit is beschreven in Appendix 1.

Bovendien verzoekt ze u in appendix 2 en 3 bij I het tweede deel in te vullen (maatregelen ter beperking van ongerief).

Dit is toegevoegd in appendix 2. De hokken bevatten gedeeltelijk dichte vloer.

In appendix 3 wordt al wel wat genoemd, namelijk: 'Pigs will be monitored closely to

determine severity of E. coli symptoms. Humane endpoints are identified as described in the following section'. Is dit voldoende of wordt hier een uitgebreider antwoord verwacht?

De DEC is van mening dat de humane eindpunten (HEPs) in appendix 3 nogal extreem geformuleerd zijn en verzoekt u deze anders te definiëren, m.n. waar het gaat om koorts. Zij verzoekt u dit te wijzigen in 40.5^o, aangezien koorts >41^o op drie opeenvolgende meetmomenten kan betekenen dat er al enkele dagen sprake is van >40^o. Bovendien verzoekt zij u duidelijker aan te geven of de HEPs worden toegepast bij het optreden van alle vier (en/en) of bij een van de beschreven omstandigheden (of).

Het humane eindpunt m.b.t. koorts is aangepast van >41^o naar >40.5^o. HEPs worden toegepast bij optreden van één van de beschreven omstandigheden. Dit is ook duidelijk gemaakt in J.

M.b.t de NTS:

De DEC verzoekt u bij 3.4. toe te voegen, dat de negatieve gevolgen van het besmettingsmodel worden beperkt door het toepassen van HEPs.

Dit is toegevoegd.

Daarnaast verzoekt ze u bij 3.5. de procentuele verhouding tussen de dieren die licht en matig ongerief ondervinden in overeenstemming te brengen met de appendices.

Dit is niet aangepast want het klopt zoals het nu in de NTS staat. We hebben hier gekeken naar de totale project aanvraag (de combinatie van de drie appendices), dus hier kan wat verwarring zijn ontstaan. Hierbij de berekening om te laten zien hoe deze percentages tot stand zijn gekomen. Ik hoor het graag mochten hier nog onduidelijkheden over zijn.

*In appendix 1 'Nursery pig studies' (B), wordt beschreven dat de aanvraag geldt voor een totaal van 5520 dieren. Daarnaast wordt bij K beschreven dat verwacht wordt dat hiervan 720 dieren matig ongerief zullen ondervinden. In appendix 2 'Blood and tissue collections' wordt genoemd bij K dat alle dieren licht ongerief zullen ondervinden. Ten slotte wordt in appendix 3 'E. coli challenge nursery pigs' genoemd dat naar verwachting 720 dieren ongerief zullen ondervinden, waarvan 80% matig ongerief (=576 dieren). Deze totale aanvraag bedraagt 8640 dieren (combinatie van de drie appendices). Hiervan wordt verwacht dat 720 + 576 (= 1296) dieren matig ongerief ondervinden. Voor de gehele aanvraag wordt dus verwacht dat 15% van de dieren matig ongerief zal ondervinden (=1296/8640*100), en 85% licht ongerief.*

Bovendien verzoekt ze u de formulering bij 4.2. te wijzigen in "Het aantal benodigde dieren wordt per studie statistisch bepaald" (aangezien anders de suggestie wordt gewekt dat er ook meer dieren kunnen worden gebruikt).

Dit is aangepast.

In de laatste alinea geeft u aan dat er maatregelen worden genomen wanneer welzijn aangetast lijkt. De DEC verzoekt u dit nader te specificeren, aangezien er wordt gevraagd om de maatregelen te vermelden.

Dit is toegevoegd. Voor de dieren in het besmettingsmodel zijn humane eindpunten vastgesteld. Voor de rest van de dieren worden geen problemen verwacht ten aanzien van het welzijn waarbij ingegrepen zou moeten worden. Mochten er wel problemen ontstaan, kunnen (afhankelijk van de problemen) dieren uit proef worden gehaald, medicatie ontvangen, of geëuthanaseerd worden.

Tot slot verzoekt de DEC u de NTS zo nodig aan te passen conform de aanpassingen in het projectvoorstel en de appendices.

Dit is aangepast. Bij Verfijning is toegevoegd dat elk hok verrijkt is met een speeltje als afleidingsmateriaal.

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 aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies: n.v.t.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. Het project beoogt biomarkers te identificeren die iets zeggen over diergezondheid en onderzoeken hierbij dieren zowel voor als (kort) na het spenen alsook op latere leeftijd en zeugen. Het project bestaat uit het testen van verschillende voeders/ additieven op hun effect op darmgezondheid van dieren voor en (kort) na spenen alsook het onderzoeken van een mogelijk heilzame werking bij een gechallenged dier (E-coli-model). De aanpak is navolgbaar en helder beschreven, het vormt een samenhangend geheel.
2. De DEC heeft geen tegenstrijdige wetgeving, gericht op de gezondheid en welzijn van het dier of het voortbestaan van de soort gesignaleerd die het uitvoeren van de proef in de weg kan staan.
3. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel is het identificeren van voeders of voederadditieven die de darmgezondheid van biggen van jong tot oud kunnen verbeteren en daarnaast het identificeren van biomarkers voor darmgezondheid en immuuncompetentie.
Het uiteindelijke doel van de aanvraag is het bijdragen aan een voederpalet voor biggen dat bijdraagt aan een verhoogde dier- en volksgezondheid, een verhoogd dierenwelzijn en aan het verminderen van antibioticumgebruik.
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
Doeldieren: welzijn en gezondheid
De onderzoeker/ het instituut: economisch belang en kennisvermeerdering
De sector/ industrie: economisch belang
Maatschappij: Gezondheidsbelang – Minder antibioticagebruik; sociaal acceptabele productie (door verbeterd dierenwelzijn).
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 onderzoeksgroep die de proeven in dit project uitvoert heeft de nodige expertise om het beste resultaat te waarborgen. De verantwoordelijke aanvrager van het huidige project is een wetenschappelijk ervaren medewerker. Naast de aanvrager bestaat het projectteam uit experts met MSc- of PhD-diploma's in relevante disciplines en ervaring in dit specifieke onderzoeksgebied.
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. De DEC acht de keuze voor het testen van voedingsmiddelen/ additieven zowel voor als na het spenen alsook op latere leeftijd als het gaat om het identificeren van biomarkers en darmgezondheid legitiem. Het is niet duidelijk welke stoffen er zullen worden getest. Dit is uiteindelijk ter beoordeling van de IvD, waar het gaat om de specificatie. Dit project past binnen de categorie CRO, waarvoor de CCD een aparte voorziening heeft gecreëerd, waarbij de toetsing van de concrete additieven aan de IvD wordt overgelaten en eventueel wel vooraf of achteraf rapportage aan de CCD wordt gevraagd. De onderzoeker heeft een indicatie gegeven van het proces dat leidt tot de keuze van die stoffen en de selectiecriteria op hoofdlijnen die zullen worden gehanteerd. Voor de DEC is dat afdoende.

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: Er wordt geen pijnbestrijding toegepast. Daarnaast kan er sprake zijn van hergebruik van dieren. De keuze hiervoor is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
10. De dieren worden niet altijd gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen om bijlage III van richtlijn 2010/63/EU. In dierproef type 1 worden in sommige gevallen varkens individueel gehuisvest voor maximaal 5 dagen. Deze varkens hebben een hok van 0.75 m² (minder dan vereist volgens de richtlijn); in dierproef type 1 en 2 ontbreekt bedding. De keuze hiervoor is voldoende onderbouwd.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als licht/matig voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. D.m.v. humane eindpunten (HEPs) wordt voorkomen dat het ongerief boven "matig" uit komt. Bij een deel van de dieren (besmettingsmodel) kan diarree en verminderde voeropname optreden. Daarnaast kan de individuele huisvesting van een ander deel van de dieren (maximaal 5 dagen) verhoogde stress opleveren. Het nemen van bloedmonsters (bij alle dieren) kan een lichte vorm van stress veroorzaken bij de varkens.
12. Naast ongerief is er geen aantasting van de integriteit van het dier, anders dan voortvloeiend uit de proefbehandelingen (de heilheid en gaafheid van de dieren worden niet aangetast en de afhankelijkheid van de mens niet vergroot).
13. De DEC heeft vastgesteld dat de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en dat goed is ingeschat welk percentage van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken.

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 reactie van een varken op voeding is multifactorieel en bestaat uit een groot aantal fysiologische processen. Deze processen zijn tot op heden nog te complex om nagebootst te worden met alternatieve technieken. Onderzoek vindt plaats aan 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. Het minimale aantal benodigde dieren wordt per studie statistisch bepaald. Dit aantal zal, waar mogelijk, worden verminderd op basis van eerder behaalde proefresultaten.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. Het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Desondanks zijn er ook HEP's ingesteld in de experiment 3. Bloedafname vindt zo mogelijk uit het oor plaats. In geval van individuele huisvesting kunnen de dieren elkaar wel zien, horen en ruiken. De DEC ziet geen extra mogelijkheden voor verfijning, anders dan die de onderzoeker nu toepast.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

17. De dieren worden van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven.
18. Een deel van de dieren wordt gedood in het kader van het project. Dit is noodzakelijk voor het behalen van de doelstellingen van het project: Een aantal effecten wordt beoordeeld in weefseltissues van de dieren. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag van het project is: weegt het ontwikkelen van nieuwe producten voor het verbeteren van darmgezondheid bij varkens op tegen het gebruik van 8640 proefdieren, die licht (85 %) of matig (15 %) ongerief ondervinden?
2. In de afweging heeft de DEC geconstateerd dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang. Zij heeft meegewogen dat er gezien het directe doel voor de onderzoekers/ het onderzoeksinstituut sprake is van een beperkt voordeel. Het gaat

hierbij om een economisch voordeel en kennisvermeerdering. Ook al leidt het project niet tot de doelen m.b.t. verbetering van darmgezondheid bij varkens, dan nog genereert het kennis (bijdragen aan een databank). Als het project zijn uiteindelijke doel haalt is er voor de doeldieren uiteindelijk sprake van een reëel en belangrijk voordeel. Het gaat hierbij om de waarden van gezondheid en welzijn. Voor de varkenshouders is er dan sprake van een (beperkt) economisch voordeel door vermindering van de ziektelast. Daarnaast kan het bijdragen aan een verbeterde maatschappelijke acceptatie, waar enerzijds de boeren/ de sector belang bij hebben, anderzijds heeft de maatschappij belang bij een productiewijze die aansluit bij (breed) gedragen waarden. Daarnaast is er voor de maatschappij er sprake van een gering (gezondheids)belang door verminderd antibioticagebruik. Tot slot zijn de waarden van de proefdieren in het geding. Een deel van de dieren zal maximaal matig nadeel ondervinden als gevolg van de handelingen binnen dit project. Gezien de bovengenoemde waarden bevorderd kunnen worden als gevolg van de resultaten van dit project acht de DEC het ethisch verantwoord dit onderzoek uit te voeren met maximaal 8640 dieren die licht tot 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.

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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Provimi BV



**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
AVD2200020171646

Datum 20 juni 2017

Betreft Aanvulling aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 3 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Screening of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs" met aanvraagnummer AVD2200020171646. 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

U beschrijft dat de dieren ziekteverschijnselen zoals koorts en diarree kunnen ondervinden vanwege de E.coli besmetting. U past hiervoor geen pijnbestrijding toe. In dit geval moet u daarom bij punt H. in bijlage 3.4.4.3 onderbouwen waarom dat niet mogelijk is.

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. Als u goedkeuring krijgt op uw aanvraag, kunt u daarna beginnen met het project.

Datum:

20 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD2200020171646

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.

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Provimi BV

Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401
2500 EK Den Haag
www.centralecommissiedierproeven.nl

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD220020171646

Uw referentie

Bijlagen

1

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 3 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Screening of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs" met aanvraagnummer AVD2200020171646. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 27 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof een onderbouwing voor het niet toepassen van pijnbestrijding. U heeft bijlage 3.4.4.3 aangepast.

Op 25 juli 2017 hebben wij telefonisch contact gehad over de speenleeftijd van de biggen. In uw aanvraag beschrijft u dat de speenleeftijd van de biggen tussen de 21 en 30 dagen ligt. In de praktijk blijkt dit gemiddeld dag 22 te zijn. In uw aanvraag beschrijft u dat het moment van infectie op dag 0-8 na spenen ligt. U voert gemotiveerd aan dat het te kort na het spenen infecteren van de biggen substantieel nadelig invloed heeft op het eind resultaten van dit onderzoek.

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 specifieke voorwaarde over de speenleeftijd van de biggen en het moment van infectie wordt gesteld, omdat de CCD een ethisch dilemma signaleert met betrekking tot de intensieve veehouderij en de vroege speenleeftijd van biggen en de nadelige effecten op dierenwelzijn.

U kunt met uw project "Screening of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs" starten.

De vergunning wordt afgegeven van 25 juli 2017 tot en met 30 juni 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

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

Datum
25 juli 2017

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD220020171646

daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende (algemene) voorwaarden 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. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving liggen ten grondslag aan dit besluit.

Bezwaar

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

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

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

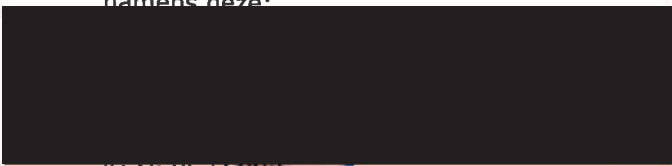
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

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

Meer informatie

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

De Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:


Algemeen Secretaris

Dit besluit is genomen met inachtneming van het Besluit mandaat, volmacht en machtiging van de Centrale Commissie Dierproeven CCD 2014 zoals de Centrale Commissie Dierproeven heeft vastgesteld op 19 december 2014, ref 2014-04 en is gepubliceerd in de Staatscourant van 2 januari 2015, Nr. 163

Bijlagen

- Vergunning

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan
Naam: Provimi BV
Adres: [REDACTED]
Postcode en woonplaats: [REDACTED]
Deelnemersnummer: 22000

of different nutritional strategies coinciding with biomarker identification in order to improve gut health in pigs" met aanvraagnummer AVD2200020171646, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Research Scientist.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 3 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 13 juni 2017, ontvangen op 13 juni 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 27 juni 2017, 25 juli 2017

Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1 Nursery pig studies	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	5520	13% Matig 87% Licht
3.4.4.2 Blood and tissue collection studies	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	2400	Licht
3.4.4.3 E. coli challenge nursery pigs	Varkens (<i>Sus scrofa domesticus</i>)	720	80% Matig 20% Licht

Voorwaarden

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

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

De biggen krijgen na het spenen voldoende tijd om te acclimatiseren en de dierproeven worden niet eerder gestart dan dat de dieren minimaal 28 dagen oud zijn. Dit sluit aan bij de beoogde wenselijke praktijk.

Gedurende de looptijd van de vergunning, koppelt de aanvrager aan de CCD terug welke soort teststof, welke type dierproef en bijbehorend ongerief is uitgevoerd onder deze vergunning. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 31 maart door de CCD ontvangen zijn en rapporteert over het afgelopen kalenderjaar (1 januari - 31 december). Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken. Wanneer u overtuigend en onbetwistbaar kan aantonen dat er geen gegevens over de geteste stof kunnen worden vrijgegeven omdat de opdrachtgever deze als vertrouwelijke informatie heeft geclassificeerd kunt u deze informatie buiten de rapportage houden.

Datum
25 juli 2017

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD220020171646

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.

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdooving

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

Datum
25 juli 2017

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD220020171646

zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

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

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

Inventaris Wob-verzoek W17-12									
nr.	documenten NTS20171668	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x		x	x	
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5				x		x	x	
9	Appendix				x		x	x	
10	DEC-advies				x		x	x	
11	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
12	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x		
13	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
14	Advies CCD		x						x
15	Beschikking en vergunning				x		x	x	

19 MEI 2017

AVD 10400 2017 1668

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

Ja > Vul uw deelnemernummer in
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

10400

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?

Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.

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

Naam instelling of organisatie

Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde

KvK-nummer

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.

Straat en huisnummer

Postbus

Postcode en plaats

Iban

Tenaamstelling van het rekeningnummer

Akkermaalsbos 12

59

6700AW Wageningen

NL10RABO0397066465

Wageningen UR

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker

(Titel) naam en voorletters

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

Email adres

Dhr. Mw.

onderzoeker

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

(Titel) naam en voorletters
Functie
Afdeling
Telefoonnummer
Email adres

Dhr. Mw.

onderzoeker

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
Functie
Afdeling
Telefoonnummer
Email adres

Dhr. Mw.

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

Wijziging op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het Dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

2.3 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 startdatum

1-8-2017

3.2

einddatum van het project? Wat is de titel van het project?

1-8-2022

Nutritional Physiology and Metabolic Health in human, mouse as a model

3.3

Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?

Voedingsfysiologie en Metabole Gezondheid in muis als model voor 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 Wageningen UR

Postadres

Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen

E-mailadres

dec@wur.nl

4 Betaalgegevens

4.1

Om welk type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning €

1827

4.2

Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD

Wijziging €

Via een eenmalige incasso

Na ontvangst van de factuur

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.

5 Checklist bijlagen

5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

Verplicht

- Projectvoorstel + 5 bijlagen
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen, indien van toepassing

- Melding Machtiging
 Bestelorder WUR1059476

6 Ondertekening

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

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). 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.

Centrale Commissie
Dierproeven Postbus 20401
2500 EK Den Haag

- dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
- dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
- dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening



**Form
Project proposal**

- This form should be used to write the project proposal 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.	Nutritional Physiology and Metabolic Health in human, mouse as a model

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.

Worldwide obesity has more than doubled since 1980. Recent World Health Organisation (WHO) data show that in 2014, more than 1.9 billion adults, 18 years and older, were overweight with a Body mass index (BMI) over 25. Of these over 600 million were obese (BMI over 30), and numbers keep increasing. Of note, most of the world's population live in countries where overweight and obesity kills more people than underweight. In The Netherlands, more than half of the population in the age group 30-70 years has overweight, and 13% is obese, which equals the world's average. Obesity is a well-known risk factor for the metabolic syndrome, insulin resistance, type 2 diabetes, cardiovascular diseases, and several forms of cancer like colon cancer and breast cancer. Metabolic syndrome is defined as central obesity plus 2 of the following factors: hypertension, low HDL-cholesterol, elevated blood glucose level and/or elevated triglycerides level. In the Netherlands, according to this definition, 34% of men and 24% of women suffer from the metabolic syndrome (Blokstra et al., Eur J Cardiovasc Nurs 2012).

Not only a direct effect of higher energy intake (food) than energy output (energy expenditure) is underlying the increase in overweight, also metabolic programming plays an important role. Metabolic programming is defined as metabolic factors acting during limited and sensitive time periods of pre- and postnatal development which can induce lasting effects on health and disease risk in later life up to old age (Koletzko et al., Am J Hum Biol 2005). Indeed, increased weight gain in the first 2 years of life leads to increased adipogenic activity and increased long-term risk of later obesity and associated non-communicable diseases (NCD) such as type 2 diabetes (Koletzko et al., Am J Clin Nutr 2011).

Calorie restriction and even bariatric surgery are examples of approaches to combat overweight/obesity and its associated metabolic diseases, but unfortunately, they fail to be successful in reducing weight and improving metabolic health and flexibility, partly due to high relapse rates (e.g. Arterburn et al., Obes Surg 2013). Thus, there is an urgent need to improve metabolic health via alternative routes, of which nutrients offer several attractive aspects even though many knowledge gaps exist in this domain.

Fundamental research has identified several proteins that function as central hubs in the regulation of energy metabolism. These findings make such proteins attractive therapeutic targets in the treatment of the metabolic syndrome and metabolic diseases like type 2 diabetes. Importantly, for some of these targets it has indeed been shown that these can be modulated by nutrients. However, in most cases effects on metabolic health have not yet been proven, but claims are predominantly based on theory or in vitro studies. In our ongoing research, we regularly identify nutrients that are able to modulate such targets (leads), and thereby are hypothesized to improve metabolic health and/or flexibility.

Testing of nutrients that target metabolic syndrome and metabolic diseases is done in distinct steps. An essential step in this cascade is an in vivo assessment in a model organism to show effectiveness in targeting a NCD. Standard measures in this type of studies include determination of adiposity, insulin resistance, and metabolic rate. Also the use of indirect calorimetry is a proven accurate method to investigate energy expenditure and oxidative substrate preference. Indirect calorimetry is performed by a closed lid on top of the homecage. This lid contains an air-inlet and air-outlet connected to control units and sensors with a steady airflow through the cage; measuring oxygen consumption and carbondioxide production allows to determine energy expenditure (kJ/min) and substrate usage (ratio of carbohydrate versus lipid oxidation in case of non-protein respiratory quotient). Moreover, indirect calorimetry system also has a food and water sensor to measure intake in a real-time mode, and infrared beams in the horizontal plane to measure real-time activity. More recently, shown added value of testing metabolic flexibility, induced by a fasting-refeeding challenge or a hypoxia challenge, using the indirect calorimetry system, as sensitive measure for metabolic health (). Using combined sensitive measures in one integrative manner (metabolic flexibility using indirect calorimetry, challenge test like an oral glucose tolerance test or the described challenge tests in indirect calorimetry, body composition using Echo-MRI, molecular responses on tissue level) and short assessment will provide high applicability and power. For Echo-MRI measures, an individual mouse is put within an open plastic tube -with normal air available- in which they can move freely. This tube is positioned within the Echo-MRI equipment and a measurement lasts from 30 to roughly 60 seconds. Primary output is given as lean mass (g) and fat mass (g).

In applied research, there is a need for a sensitive model that can be used to study the hypothesized beneficial effects of nutrients. Moreover, such studies will contribute to fundamental knowledge about detailed mode of action and molecular regulation of physiological processes. The combination of both applied and fundamental aims of this research will benefit the project via the following loop: improved fundamental insight might improve identification of new targets and leads for further applied research, which will lead to more fundamental and applied knowledge.

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 key aim of this research is: to study the effectiveness in a direct or programmed manner of nutrients in targeting metabolic diseases, using a validated integrative physiological relevant in vivo model.

Metabolic health and metabolic flexibility as marker for metabolic health, largely depend on (regulation of) cellular substrate metabolism and organ function.

The present proposal contains several animal studies to investigate this effectiveness, which are primarily in the field of fundamental knowledge when underlying mechanisms are investigated. Simultaneously, several studies can be considered as applied scientific research; early-life nutritional interventions resulting in later-life health improvement are the first step as pre-clinical studies in ultimately supporting future clinical studies.

Moreover, pre-clinical studies are a prerequisite for clinical studies, especially when it involves toddlers and children of young age. Each study will answer a specific research question of applied and/or fundamental origin:

- Can selected nutrients beneficially modulate substrate metabolism and organ function as measured using our developed integrative in vivo model? (applied)
- Which molecular processes that relate to substrate metabolism and organ function are modulated by selected nutrients? (fundamental)

FEASIBILITY

The expertise required for this research (indirect calorimetry, challenge tests including oral glucose tolerance test and hypoxia challenge, body composition analysis (Echo-MRI); details in appendix) is state-of-the-art, operational and available at our facility. The present proposal will benefit from our significant experience and expertise in performing in vivo experimentation, which has resulted in a proven well-structured coordination of studies with laboratory animals. The present proposal will use our integrative in vivo model that is designed to investigate nutrients targeting metabolic diseases and thereby improving metabolic health. In this context, various nutrients will be examined. The precise concentrations that will be used depend on data generated in previous (primarily in vivo) experiments, with for each protocol a well-developed rationale. The nutrients used in physiological dose ranges will be selected from the following subgroups of nutrients: [redacted] dietary [redacted] [redacted] dietary [redacted] differing in [redacted] of [redacted]), dietary [redacted] (varying in [redacted] and [redacted]), [redacted] with a role in metabolism [redacted] and [redacted] (single [redacted]), especially [redacted].

Animal studies are subdivided in five different categories: 1) direct metabolic health-effects by nutrients, 2) metabolic programming effects by nutrients, 3) longitudinal effects by nutrients in tissue-specific [redacted] knockout mice, 4) dose effects - interaction between natural nutrients, especially [redacted] and 5) [redacted] using [redacted] and our [redacted] indirect calorimetry system for real-time detection. It can be envisaged that usage of such an [redacted] for non-invasive [redacted] oxidation measurements is part of a category 1-4 study to identify adaptations in [redacted].

3.3 Relevance

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

The scientific value of this proposed research is that detailed fundamental insight will be obtained by studying nutrient-induced molecular regulation of metabolic-related processes in a direct fashion (category 1 study) and in a programmed manner into later-life (category 2 study). We will characterize these molecular effects in multiple target tissues primarily focusing on adipose tissue(s), but liver and muscle tissues are considered as important target organs as well, in order to improve our understanding of mechanistic regulation of nutrient-induced improvement of metabolic health. Also, our integrated in vivo test system increases the quality of information from our proposed studies, because paired data of multiple endpoint measures can be obtained. Next, confirmation of our hypothesis that the selected nutrients can modulate metabolic processes at the molecular level (in tissues obtained from these studies) and thereby target metabolic disease in either a direct manner or via metabolic programming into adulthood is essential and a prerequisite for further lead optimization, toxicity evaluation, and pre-clinical evaluation.

The social relevance of this proposal is that using our integrative testing strategy shortens the duration of the animal experiment, while at the same time it increases the number of measurements (paired data), which is a significant improvement from an ethical point of view. This will not only be observed as a direct effect of nutrient(s), but also by its metabolic programming effects resulting in later-life health improvement. The modulatory effect of nutrients on metabolic health will be evaluated, thus contributing to identification of nutrients that target metabolic health. These nutrients, including [redacted] (especially [redacted], or [redacted] (e.g. [redacted]), can ultimately be used in the treatment or prevention of (later-life) metabolic diseases.

3.4 Research Strategy

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

In order to answer the aim of the present proposal, we will use our integrative in vivo model for sensitive identification of beneficial health effects as induced by the selected nutrient. Selection is, and will be, based on prior knowledge from either published or our own in vitro studies or non-overlapping in vivo studies. As an example, the [REDACTED] shows in silico an [REDACTED] of the [REDACTED] et al., [REDACTED] [REDACTED]) which might resemble the anti-diabetic pharmacological compound [REDACTED]. In vivo, a direct effect has been described for [REDACTED] in rats ([REDACTED] et al., [REDACTED]), but effects on [REDACTED] as nutritional treatment of metabolic health remain elusive. In all cases, doses will be in the physiological range, not in the toxicological range, and will be discussed with the IvD.

Based on the research questions of the overarching (larger PhD) project(s), a choice selection will be made for the study category, that is for instance either analyzing a direct effect (e.g. [REDACTED], or a metabolic programming effect (e.g. [REDACTED] or [REDACTED]).

As the study design also depends on prior knowledge, it is hard to provide a full overview of study designs for different animal studies. As an example, for a category 2 study (metabolic programming), we will use breeding [REDACTED] mice to obtain offspring in standardized nests, being re-distributed at post-natal day (PN) [REDACTED] over the dams and remain in this setting until weaning. From PN [REDACTED] till PN [REDACTED] they will be fed the intervention diet(s) versus control in different groups, and during the last few days of intervention, continuously measured in our indirect calorimetry system. A subset of animals will be sacrificed thereafter for direct effects measurements, while the remainder of the animals will be fed for [REDACTED] [REDACTED] a similar humanized high fat diet to induce fat mass and body weight gain, resulting in an adverse situation. If the intervention diet has programming potential, a beneficial health effect like reduced fat mass and body weight gain can be identified. If the beneficial health effect has a more metabolic origin without changes in fat mass or body weight, the indirect calorimetry measurements at the end of the high fat diet-feeding will be able to identify those. Moreover, a single challenge test around e.g. PN77 will add to the paired data measures and increases power to detect (programmed) metabolic differences. Such a programming study can include [REDACTED], as our indirect calorimetry system has [REDACTED] [REDACTED] to sensitively detect [REDACTED] like [REDACTED].

In all situations, nutrient dose(s) will be at relevant physiological nutritional level. If a category 4 study (e.g. doses of [REDACTED]) is planned, precautions will be made in order to have [REDACTED] levels in diets and the level of different doses will be discussed beforehand with the IvD.

Overall, we aim to study beneficial effects of nutrient interventions, therefore the dose(s) will not cause any additional severity.

In studies, where applicable, we will include a basal group (sacrificed before intervention), and a control group. The control group consists of animals that receive the diet without the specific nutrient and run parallel to our intervention group(s). These animals are included to determine nutrient-mediated effects on studied parameters. However, as an example, within a programming study (category 2 study), sacrifices at PN [REDACTED] will not be of added value and are therefore not included.

Overall, selected nutrients have added interest based on for instance recent, as of yet unpublished, data; these include specific [REDACTED] (e.g. [REDACTED] versus [REDACTED], specific [REDACTED] versus [REDACTED]), the [REDACTED], and [REDACTED]. This latter class of nutrients is foreseen to be analyzed using a category 4 study, in which the interaction with a higher dietary [REDACTED] level or an altered dietary [REDACTED] will be used as different intervention groups. Usage of [REDACTED] can be foreseen in future clinical studies focusing on toddlers in order to support beneficial programmed metabolic health into adulthood (applied research).

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.

Within this proposal we discriminate several categories of animal studies, although all belong to the same overarching aim: to study the effectiveness -in a direct or programmed manner- of nutrients in targeting metabolic diseases thus beneficially improving metabolic health, using a validated integrative physiological relevant in vivo model. Based on prior knowledge, we will select the specific type of intervention category or categories (see below) best fit to the research question. It is therefore eminent that every nutrient will be analyzed in only a subset of categorical studies, and not by all.

Overall, as mice and humans are 99% genetically similar (Ghunter and Dhand, Nature 2002), including most genes associated with (metabolic) disease, mice are widely accepted to be an experimental model to study human metabolic disease. In addition, C57BL/6J mice are recognized to have an eating behaviour similar to humans, e.g. overeating on a high-fat diet and thereby developing diet-induced obesity and insulin-resistance. The analysis in various tissues to study molecular regulation of metabolic health cannot be realized in humans (sampling of biopsies of liver, muscle etc. are not feasible). We have selected the C57BL/6J strain, and in more detail the [REDACTED] strain, because these mice are sensitive to weight gain and insulin resistance when exposed to a western high-fat diet [REDACTED]. In more detail, the [REDACTED] substrain contains -like humans- a functional [REDACTED] gene encoding the [REDACTED] metabolic relevant [REDACTED], while the standard [REDACTED] strain from [REDACTED] has a dysfunctiona [REDACTED] protein. We will also make use of tissue-specific [REDACTED] knockout mice, which lack the [REDACTED] protein [REDACTED] metabolic processes. Knock-out mice for the two tissues we specifically focus on, [REDACTED] and [REDACTED] were generated using the Cre-Lox system, and are available on a [REDACTED] functional and non-functional background, all on an otherwise full [REDACTED] background. We focus on [REDACTED] and metabolic regulation as the pivotal function in (metabolic) health and its regulation. Furthermore, the results of these studies can be used for comparison to the other animal experiments carried out in our group as these also used the C57BL/6J strain. Moreover, this also allows us to use (tissue-specific) knockout mice of the same background strain to be used for comparison and elucidation of a specific protein. Finally, the highly controlled conditions, also in our indirect calorimetry system, together with large enough sample size allows measurements of small but significant and relevant differences between dietary groups. Several of the proposed studies (categories 2-4) will be performed in a mouse model of diet-induced obesity of which, besides non-invasive measures and minimal blood sampling during the study when an oral glucose tolerance test is included, [REDACTED], and [REDACTED] tissues will be harvested at the end of the intervention.

Specifics of the differences between the proposed animal studies are as per category:

- 1, direct effect: after a run-in reference diet from PN [REDACTED], an intervention period of [REDACTED] with appropriate control dietary groups, intervention dietary groups, and if possible, a positive control dietary group. Indirect calorimetry is performed at the start and end of intervention period. In this way, direct effects of a specific nutrient are investigated.
- 2, metabolic programming: standardized nests will be stratified at PN [REDACTED], and subsequent groups will be fed the intervention diets for [REDACTED]. A subgroup will be sacrificed at PN [REDACTED], while the remainder of the animals will switch to the high fat diet for another [REDACTED]. Indirect calorimetry will be performed at the end of the intervention and high fat diet periods. A challenge test, like oral glucose tolerance test, hypoxia challenge or a fasting-refeeding challenge in our indirect calorimetry system, is scheduled minimally after [REDACTED] feeding the high fat diet. In this way, beneficial health effects in adulthood -obtained by metabolic programming during early life- is investigated. This differs from a direct effect (category 1), as health effects were 'programmed' in early life with a [REDACTED] weeks intervention period, and all groups received the same high fat diet thereafter.

3, longitudinal effects: after weaning, mice will be stratified and fed a high versus low fat diet for another [redacted] weeks, or [redacted] weeks. Animals will undergo an oral glucose tolerance test in week [redacted] while in the latter case in week [redacted], a subgroup of mice fed the high fat diet will be switched to the low fat diet, a high fat restricted diet, or remain on the high fat diet for another [redacted] weeks. A fasting-refeeding challenge is scheduled around week [redacted] and an oral glucose tolerance test in week [redacted]. Subsets of mice will be sacrificed in week [redacted].

4, dose-interaction effects: after a run-in period, mice are subdivided over several groups and fed a control (e.g. low fat) versus adverse (e.g. high fat) diet with and without a specific nutrient (e.g. [redacted], or [redacted]) for up to [redacted] weeks. It can also be envisaged that for instance several doses of a specific [redacted] are compared against the same control diet, while keeping in all cases an [redacted] status.

5, [redacted]: as part of studies 1-4, [redacted] can be implemented in order to sensitively analyze [redacted] metabolic oxidation of [redacted]. Our indirect calorimetry system has [redacted] in order to be able to detect those [redacted] sensitively and in real-time while being non-invasive. If follow-up at organ level is required, this results in sacrifices shortly following the [redacted] bolus, which cumulatively is called [redacted]

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

The experiments that we propose are closely linked since we will use the integrative in vivo model for testing the effects of nutrients. In all studies, the intervention period will start at PN [redacted], that is, the start of the post-weaning phase. This allows us also to study metabolic programming (category 2) when mice are switched to an adverse high fat diet shortly thereafter. Recently, we identified several nutritional interventions that program metabolic health in later life [redacted] et al., [redacted] et al., submitted, [redacted] et al., submitted, [redacted] et al., submitted), showing the power of such interventions in early life to combat metabolic diseases in later life.

Studies focusing on [redacted] will primarily be performed using category 4 studies, while a category 1 study will be selected to investigate e.g. the [redacted] for its in vivo [redacted], so the dietary background should contain specified type of [redacted] and appropriate control [redacted] diets should be taken along, as well as the positive control [redacted]. Category 1 studies start with intervention at post-weaning day PN [redacted], while category 4 studies might also be performed in adult mice.

Basal measurements versus challenge tests have shown the added value of such challenges in identifying underlying metabolic dysfunction (e.g. Duivenvoorde et al., PlosOne 2015; Duivenvoorde et al., Pflugers Arch 2015; Bardova et al., Biochemie 2016).

For the first sets of experiments, we have selected 1 nutrient to study its direct effects [redacted], category 1), and another nutrient for its metabolic programming effects [redacted] as [redacted] and [redacted], category 2), including [redacted] (category 5). It is foreseen that for [redacted] or [redacted] studies, we will use a category 4 study setup.

Based on our ongoing research we will select nutrients from our focused subset of nutrients as described under point 3.2 Purpose, to test their beneficial modulation on metabolic health in our integrative in vivo model. For specifics, see appendices 1 - 5.

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	1. Direct nutritional effects on metabolic health and flexibility
2	2. Metabolic programming effects of metabolic health and flexibility

Serial number	Type of animal procedure
3	3. Longitudinal effects by nutrients in tissue-specific [REDACTED] knockout mice
4	4. Dose effects – interactions on metabolic health and flexibility: focus on [REDACTED]
5	5. [REDACTED] to investigate non-invasive [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'.	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>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>1. Direct nutritional effects on metabolic health and flexibility</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	1	1. Direct nutritional effects on metabolic health and flexibility
Serial number	Type of animal procedure					
1	1. Direct nutritional effects on metabolic health and flexibility					

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 receive from weaning at PN [redacted] onwards for [redacted] weeks the reference diet, whereafter mice are stratified by body weight/fat mass. Next, groups receive the different intervention diet(s) versus appropriate control diet(s). The intervention period lasts for [redacted] and food intake and body weights will be measured weekly. Body composition analysis using our non-invasive Echo-MRI is performed on a (bi)weekly schedule. Both at the start and end of intervention period, indirect calorimetry measurements are scheduled for detailed analysis of basal whole body energy expenditure and substrate usage; metabolic flexibility will be measured only once at the end of the study. Therefore, mice will remain in the indirect calorimetry system for up to 3 to 5-7 days, depending on in- or exclusion of a specific challenge.

Mice will have ad libitum access to food and water.

At the end of the experiment, animals are sacrificed and blood and tissues will be harvested, weighted, snap frozen, and stored at -80°C until further analysis.

We aim to study beneficial effects of nutrient interventions, therefore the dose will not cause any additional severity. It is common to select two doses and in all situations, dose selection is within physiological ranges, and will be discussed with the IvD. Nutrient selection will be based on prior knowledge of published data (in vitro, in silico) and -as of yet- unpublished data (in vitro, in vivo). For example, the natural [redacted] has been shown to have [redacted] potential in silico [redacted] et al., [redacted]), and in vivo it was shown it has [redacted] ([redacted] et al., [redacted] et al., [redacted]). This [redacted] resembles the pharmacological widely used anti-diabetic drug [redacted] which [redacted]

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

From our breeding pairs, offspring mice will be distributed at post-natal day PN [redacted] over standardized nests with similar ratio of males/females. If needed, surplus pups will be culled at PN [redacted]. After weaning, they receive for [redacted] weeks the standard reference diet ad libitum and are at the end stratified by body weight and distributed over the different intervention groups. Intervention diets are provided for [redacted] ad libitum. Water is always available ad libitum. At the start and end of the intervention period, our integrative test phase using our non-invasive indirect calorimetry system is key in this experiment. This benefits animal welfare as e.g. principally non-invasive measurements are used. Maximal discomfort is moderate due to individual housing. In principle, both males and females will be analyzed, as sex-dependent differences in metabolism are potentially present. If this is known from literature, we might select otherwise for a specific nutrient.

Indirect calorimetry measurements include whole body energy expenditure, substrate usage, and total activity continuously and in real-time mode measured. Moreover, both water and food intake are recorded real-time. The mice will remain in their home cage with bedding for this assessment, which lasts up to 5-7 days in case a challenge test is included. As an example, for the metabolic flexibility assessment, the mice will be fasted during

the inactive light phase and re-fed prior to the following active dark phase. The metabolic response to refeeding will be assessed in the indirect calorimetry system, and [REDACTED] shown that such a fasting-refeeding response is a sensitive measure to assess metabolic flexibility ([REDACTED] et al., [REDACTED]). Moreover, if we use [REDACTED] for refeeding, we are capable to measure [REDACTED] and in real-time mode the substrate usage by [REDACTED] the indirect calorimetry system. For instance usage of [REDACTED] from [REDACTED] instead of [REDACTED] [REDACTED] already generates enough discrimination for such an analysis. Alternatively, when [REDACTED] like [REDACTED] or [REDACTED] are used, a single oral gavage is needed.

Measurements in the first week will give insight into immediate responses of the nutrient intervention, while measurements in the last week are essential to show long lasting nutritional responses. Those responses are mostly expected in the later stage, and therefore we will measure whole body energy expenditure and metabolic flexibility only once at the end of the study.

For proper scientific measurements of the animal responses in the indirect calorimetry system we will assess body weight and body composition (fat and lean mass) using our non-invasive Echo-MRI equipment thus excluding the necessity to use anesthetics which is needed when DEXA-scan is used; this is done before and after the indirect calorimetry measurements to be able to adjust energy expenditure based on lean mass, if different. At the end of the experiment, animals are sacrificed and blood and tissues will be harvested, weighted, snap frozen and stored at -80°C, which will be used for detailed molecular studies.

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

Regarding the number of animals per group, we will use as few as possible, but as many as needed. Power calculation on our previous data shows that 12 mice per group are needed to obtain sufficient power to assess fasting-refeeding metabolic flexibility differences (measured using indirect calorimetry) induced by a nutritional intervention. For follow-up molecular analyses, e.g. global gene expression analysis, we extensively evaluated the number of samples needed and showed that n=12 is sufficient for nutritional intervention studies to detect significant and relevant differences at the level of 6-7% differential expression, taking into account the correction for multiple testing ([REDACTED] et al., [REDACTED]). Moreover, when all transcripts encoding enzymes within a single metabolic pathway are significantly regulated in the same direction (e.g. as we showed for cholesterol biosynthesis, [REDACTED] et al., [REDACTED]), this further supports the biological relevance and statistical power to detect significant differences. This is normal procedure during transcriptomics/bioinformatics analyses to analyze transcripts at the pathway level instead of at individual transcript level. Since sex differences have shown to significantly affect whole body metabolism and physiology, and therefore also the response to intervention strategies (e.g. van Helden et al., Cell Mol Life Sci 2011), we will select both sexes in our studies, unless prior knowledge suggests otherwise. As an example, beta-carotene clearly showed opposite regulation in gene expression when males and females were compared (van Helden et al., Cell Mol Life Sci 2011). It is therefore crucial to analyze (molecular) effects in both males and females.

Regarding the number of groups needed, we aim to reduce the number of groups as much as possible. It is clear that that the setup of a specific animal experiment depends largely on the nutrient being investigated. If we are aware that a positive control exists for the proposed mechanism of action by the nutrient, such a positive control group is added, but as said, this largely depends on the choice of nutrient investigated. For example, we will study [REDACTED] for its [REDACTED] activity by adding [REDACTED] to a diet containing a high [REDACTED]. As control diets, we will use the same [REDACTED] without [REDACTED], the [REDACTED] diet supplemented with the positive control, the pharmacological drug [REDACTED] and a [REDACTED]. In this case, 3 control groups are used, but if we lack a positive control group, we will make use of only 2 control groups. So for the maximal six nutrients, we schedule maximal three nutrients to be studied using three control groups, and

maximal three nutrients with only two control groups. Together, using this approach we will limit the number of groups in this experiment as much as possible, thus limiting the number of animals needed.

B. The animals

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

In our proposal we discriminate the following groups:

Control group(s): animals that receive 0 mg/kg of nutrient (negative control) and run parallel to our intervention groups (e.g. Low and High dose groups). These animals are essential to determine nutrient-mediated effects on studied parameters. If applicable, we might select two additional control groups besides the control background diet without the addition of the specific nutrient: one control group is then used as a natural 'positive' control -like a [REDACTED] diet in a [REDACTED] study- and the third control group as a pharmacological control group. Showing that the natural [REDACTED] has an in vivo beneficial [REDACTED] resembling a pharmacological compound provides scientific evidence for usage of this nutrient in future foods, and allows us to analyze its molecular mechanism in a highly focussed manner.

Low group: Animals that receive the low concentration of the selected nutrient.

High group: Animals that receive the high concentration of the selected nutrient.

For Control/Low/High groups: Section is at the end of the nutrient intervention period, and all measures will be identical in Control/Low/High groups. [REDACTED] mice will be used for breeding, and the offspring for the animal experiment; the run-in diet period starts after weaning and lasts three weeks. The intervention period starts at post-natal day [REDACTED] and runs for [REDACTED], so from young age until young to middle adult age. We have selected this substrain of mice because these mice are sensitive to diet-induced weight gain and insulin resistance when exposed to a western high-fat diet [REDACTED]. Furthermore, the data of this experiment can be compared to available in-house data of our group, as these data is also from the C57BL/6J strain.

One of our critical parameters is metabolic flexibility as measure for metabolic health (measured using indirect calorimetry), which will be measured in the Control, Low and High group. The exact values used for the calculation below are based on data derived from a study in which relevant biological significance of the intervention was demonstrated, therefore the values used in the power calculations have a solid biological background. The calculation showed that in studies in which effects of dietary interventions on metabolic flexibility are analyzed, at least 12 animals per group are needed to obtain sufficient power (tested one-sided). This was calculated with Java Applet for Power and Sample Size, Lenth R.V., (<http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/power>) using SD1 (SD control group)=252 ml O2/6h, SD2 (SD intervention group)=350 ml O2/6h, True difference of means = 367 ml O2/6h power=0.8.

We also checked for effects on blood glucose levels and an in-house data set showed that using 12 animals gave statistical differences with p-value<0.01 being detected. If we take this latter finding along in our cumulative evaluation on optimal animal number per group, n=12 seems appropriate and sufficient for all parameters being analyzed. Since we also will perform molecular analyses (to be measured in all groups (Basal, Control, Low, High)), including global gene expression profiling, we checked the number of animals that are needed for such analyses. Multiple studies [REDACTED] have shown that for identification of differences the use of 12 animals are optimal. In the publication of [REDACTED] et al., we describe detailed calculations on basis of group sizes and identification of significantly regulated genes (1000 times random selection of animals (different group sizes) using a data set of 12 animals). The key conclusion of this calculation was that the accepted minimum group size for identification of significant differences on gene expression level is 12 animals/group.

In conclusion and cumulatively, 12 animals per group are essential in the present study in all groups in order to draw reliable conclusions from our

data.

Within this animal experiment we plan to evaluate maximal six nutrients for their direct modulatory effects on metabolic health; for three nutrients we will use only two control groups, for the other three experiments we will use three control groups. With a minimum of n=12 per group and two concentrations (0 (control), low, high) per nutrient + natural positive group (and pharmacological control), we will maximally need 648 (288+360) animals (as both sexes are analyzed). Doses are based on prior knowledge (peer-reviewed publications, preferably based on in vivo studies, and in house data not yet published) and will be discussed with IvD. Of note, we investigate here beneficial metabolic health effects, not toxicological effects of specific nutrients. Indeed, like for [REDACTED] we previously showed that a nutritional intervention with [REDACTED] showed an absence of hepatic genotoxicity which was also observed in the organ exposed to relative highest levels of dietary [REDACTED]. Moreover, [REDACTED] intake was associated with decreased, not increased, levels of biomarkers for liver damage being ALT and AST ([REDACTED] et al., [REDACTED])

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

In this proposed study, we aim to evaluate improvement of metabolic health, which is predominantly of interest for human metabolic health, but might also have its scientific effect on production animals. Also, we aim to unravel molecular modulation of nutrient-induced improvement of metabolic health. For this, analyses in various tissues (including multiple adipose tissues, skeletal muscle and liver) are essential. Since sampling of these tissues is not preferred in humans (for instance using biopsies), we will use animal models in this study. As mice and humans are 99% genetically similar (Gunthar and Dhand, Nature 2002), including most genes associated with disease, mice are widely accepted to be used as experimental model to study human disease. The C57BL/6J mice are recognized to have an eating behavior similar to humans, e.g. overeating on high-fat diet. Therefore, these animals are a good model for research on studies that aim to investigate metabolic health improvement. Because we

aim to investigate the effects of nutrient intervention on whole body metabolism and no alternative for such complex integrative processes and organ-organ interactions are available, it is not possible to use an in vitro system, which focuses only on a single individual cell-culture system without inter-organ communication. Prior knowledge of potential effects on individual cell-types might support the choice of nutrients selected to be analyzed in vivo. Based on statistical calculations, animal use will be reduced as much as possible. Our high expertise on studies in mice ensures that we are competent in designing animal studies that require the least amount of animals with the least amount of severity. As such, we have chosen mostly non-invasive but sensitive measures to answer our research questions (refinement). Mice are always housed in their homecage with bedding and cage enrichment (refinement). The methods for body composition analysis (Echo-MRI) and indirect calorimetry are both non-invasive and provide a wealth of data on respectively body composition and whole body energy metabolism. Because these measurements are non-invasive we are able to perform these measurements at more than one time point within the same animal throughout the study. This limits variation and subsequently increases the power to detect significant differences within our experimental groups in time because of paired data, leading to reduction of animal numbers. In order to study beneficial effects of nutrient intervention and subsequent analyses for optimal dose selection for metabolic health improvement, multiple doses are essential (Slob et al., 2002). Via careful dosing selection based on state-of-the-art data (in house pre-screening data and/or scientific publications) we expect that using only two doses per nutrient (e.g. low and high dose) is suitable. The use of only two dose groups contributes to an important reduction of the animal number in the present study.

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

We have selected sensitive mostly non-invasive measurements that will not cause pain to the animals. Importantly, we analyze beneficial health effects by nutrients, no toxicological effects. Moreover, in our indirect calorimetry system the animals will remain in their own homecage which minimizes stress. Animals will be checked daily by an experienced person to assess their health condition. Based on our animal experimental set-up we do not expect any extreme discomfort (maximal severity is moderate). In any unexpected situation that an animal suffers it will be sacrificed. Humane endpoints will be determined in individual protocols in consultation with the IvD; these include e.g. reduced appetite (reduced energy intake) leading to reduced lean mass, passive behavior not due to increased obesity, or presence of erected fur. Environment: No substantial negative effects for the environment are expected.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

A literature search in Pubmed (search term: "Metabolic Diseases"[Mesh] AND "Mice"[Mesh] AND "Metabolism"[Mesh] combined with 'indirect calorimetry', intervention, nutrient, or health improvement) did only reveal a few publications that investigated the use of an integrative protocol to assess improvement of metabolic health. Discussions within our international network and at conference meetings provide additional support that our

proposed research has not been performed earlier. Per nutrient, a careful literature search is part of the standardized procedure to formulate research questions related to specific nutrients, being unique and not yet published. Our work is novel and thus ensures high impact publications.

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.

Mice will be individually housed as group-housing interferes with the study set-up by not being able to record individual food intake. Offspring mice will be individually housed as soon as they are post-weaning at PN [REDACTED], because it is essential to monitor individual food intake during the experiment, which is not possible if animals are grouped-housed. The first [REDACTED] weeks of the post-weaning period are used as control phase and by individual housing we reduce variation in food intake due to social aspects. The mice will get cage enrichment and bedding throughout the study and ad libitum food and water (except for short fasting during indirect calorimetry when a fasting-refeeding challenge is included). In such a challenge, animals will be fasted at day 4 of the indirect calorimetry measurement to ensure similar basal measurements and start values of energy metabolism of the animals. However, this fasting will be performed during the inactive phase of the animals (light phase) when mice normally do not eat; refeeding starts 1 hour prior to the dark, active phase. Therefore this adaptation is not expected to intervene with animal well-being.

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?

Summary of discomfort: During this proposed study the following discomfort is expected: individual housing, weighing, Echo-MRI, indirect calorimetry, and fasting if applicable as challenge test. Individual housing starts at post-natal day ■ and lasts for a maximum of ■ weeks. Adverse effects by the presence or absence of a specific nutrient are not expected, as we focus on beneficial metabolic health effects, not toxicological effects. We will make sure that all essential dietary nutrients are available at appropriate levels.

Explain why these effects may emerge.

Discomfort is caused by experimental approach as described in A. No additional discomfort expected.

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

We aim to minimize the discomfort as much as possible by the following actions: Animals can stay in their homecage during the indirect calorimetry measurement, which will prevent stress. Animals will be fasted during daytime (light period), during this time span mice normally don't eat, which minimizes potential discomfort. We will combine measures as much as possible, to prevent that animals are disturbed more than needed. For example, at days when weighing and Echo-MRI is scheduled we will do this in one run.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

If animals show less appetite (reduced energy intake), show passive behavior not due to increased obesity, or show erected fur, this will be considered as indications for humane endpoint. Importantly, as a result of our usage of the non-invasive Echo-MRI to measure lean mass and fat mass longitudinally, we will identify compromised health in an early phase, as loss of lean mass is always associated with disease. This is seen in an earlier phase than loss of body weight, so we can monitor in those cases the animals in more detail. Loss of 20% of body weight is considered as an unhealthy situation, although long term caloric restriction leading to an improved health condition, also shows loss of body weight which can reach a similar reduction in body weight (Duivenvoorde et al., J Mol Endo 2011). Moreover, when mice are placed within our indirect calorimetry system we measure continuously physical activity, which also allows us to monitor animals in a highly detailed manner. As in our studies all mice are growing or in adulthood, not being aged nor frail, the 20% body weight loss is calculated from the time-point where body weight changed from an increased or steady state into body weight loss. This is our primary criteria for humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

As we focus on beneficial (metabolic) health effects, we do not expect that animals will suffer from humane endpoints. Nevertheless, we cannot exclude that maybe an animal might become unexpectedly ill not related to the study setup, even though the animals are all at most into their young to middle adult age. Therefore the incidence is considered very low, if at all present.

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 the individual assessments is classified as follows: Individual housing from post-weaning until end of study (■■■■ weeks): moderate Weighing: minor Echo-MRI: minor Indirect calorimetry in home cage: minor Fasting: minor We do not expect additional discomfort from the dietary intervention. For example, our experimental high-fat diets reflect both the human energy% and saturated versus unsaturated fatty acid composition. Also, when we evaluate effects of nutrients these are selected because of their suggested beneficial effects on metabolic health. During the intervention period the cumulative discomfort is moderate (because of individual housing). Collectively, the cumulative discomfort of the interventions is considered 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.

To evaluate intervention-induced regulation of molecular processes on tissue level, tissues need to be dissected after sacrifice of the animals at the end of the intervention. These tissues will be used for detailed molecular analyses, such as global gene and protein expression profiling and mitochondrial activity measurements.

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="1355 880 1697 904">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="622 912 640 936">2</td> <td data-bbox="1355 912 1977 968">2. Metabolic programming effects of metabolic health and flexibility</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	2	2. Metabolic programming effects of metabolic health and flexibility
Serial number	Type of animal procedure					
2	2. Metabolic programming effects of metabolic health and flexibility					

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.

As gestation and lactation periods have a large effect on offspring growth, we will use breeding pairs in our facility to keep those periods of early life as controlled as possible, since we are interested in the period of post-weaning to start the nutritional intervention as part of metabolic programming. Intervention will be from post-natal day (PN) [redacted] to PN [redacted], followed for all offspring mice by a [redacted] humanized high fat diet period to investigate beneficial health effects induced by metabolic programming. Such a strategy has been used with success in our facility.

In more detail: breeding-pairs will be time-mated and nests will be standardized based on size (4-8 pups per nest) and male/female ratio, and distribution over the dams. Previous studies showed that we did not have to cull surplus pups at his stage. After weaning at PN [redacted], offspring mice will be stratified by body weight/fat mass. From PN [redacted] onward for three weeks the different intervention diet(s) versus an appropriate control diet -if applicable- is given. All mice will thereafter receive the humanized high fat diet for [redacted] weeks. Food intake, body weight and body composition (lean and fat mass) will be measured weekly throughout the intervention period, and biweekly throughout the high fat dietary period. Body composition analysis is performed using our non-invasive Echo-MRI.

Both at the end of intervention period and the high fat diet feeding, indirect calorimetry measurements are scheduled for detailed analysis of basal whole body energy expenditure and substrate usage, physical activity and metabolic flexibility. Moreover, if we use [redacted] for refeeding, we are capable to measure [redacted] and in real-time mode the [redacted] by [redacted] in the indirect calorimetry system. For instance usage of [redacted] from [redacted] in stead of [redacted] already generates enough discrimination for such an analysis. Alternatively, when [redacted] like [redacted] or [redacted] are used, a single oral gavage is needed. Mice will have ad libitum access to food and water. If it is expected that the intervention diet effects insulin resistance at later life, an oral glucose tolerance test is scheduled once at PN77. At the end of the intervention period and the high fat diet feeding, subsets of mice will be sacrificed and blood and tissues will be harvested, weighted, snap frozen, and stored at -80°C until further analysis.

We aim to study beneficial effects of nutrient interventions, therefore the dose will not cause any additional discomfort. If a single nutrient is investigated we can select two doses which in all situations will be discussed with the IVD. From past experience, the timed-mating and subset of breeding-pairs used, together with the 12 cages available in our indirect calorimetry system, determine that we can use one reference control diet versus 2 intervention diets (or two doses of one nutrient) simultaneously. Every indirect calorimetric measurement will therefore contain 4 animals per intervention group to compare the measurements directly, and multiple batches will be measured longitudinally in order to have sufficient power to detect significant differences for which we need 12 animals in total per group.

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

From our breeding-pairs, offspring mice will be distributed over standardized nests with similar ratio of males/females. After weaning, they are stratified by body weight and distributed over the different intervention groups. Intervention diets are provided for [redacted] weeks ad libitum. Water is

always available ad libitum. Thereafter the high fat diet is provided for [REDACTED], ad libitum. At the end of the intervention period and high fat diet feeding, our integrative test phase using our non-invasive indirect calorimetry system is key in this experiment. This benefits animal welfare (e.g. principally non-invasive measurements are used and the period with maximal discomfort (moderate due to individual housing) is as short as possible with maximal effectiveness in terms of effect). In principle, both males and females will be analyzed, as sex-dependent differences in metabolic programming studies are reported. If this is known from literature, we might select otherwise for a specific nutrient.

Indirect calorimetry measurements include whole body energy expenditure, substrate usage, and total activity continuously and in real-time mode measured. Moreover, both water and food intake are recorded real-time. The mice will remain in their home cage with bedding for this assessment, which lasts up to 5-7 days in case a challenge test is included. As an example, for the metabolic flexibility assessment, the mice will be fasted during the inactive light phase and re-fed prior to the following active dark phase. The metabolic response to refeeding will be assessed in the indirect calorimetry system, and we have shown that such a fasting-refeeding response is a sensitive measure to assess metabolic flexibility ([REDACTED] et al., [REDACTED]). Alternatively, if applicable, an oral glucose tolerance test will be performed once on 5hr-fasted mice around PN77. Blood will be sampled from the tail (3x 20 µl in 30 minutes) to measure circulating glucose and insulin levels.

Measurements at the end of the intervention period will give insight into immediate and direct responses of the nutrient intervention, while measurements at the end of the high fat feeding are essential to show long lasting, metabolically programmed, nutritional responses into adulthood. To measure the animal response to the indirect calorimetry measurements we will assess body weight and body composition before and after the indirect calorimetry measurement to be able to adjust energy expenditure based on lean mass, if different. At the end of the intervention period and the high fat feeding, subsets of mice will be sacrificed and blood and tissues will be harvested, weighted, snap frozen and stored at -80°C, which will be used for detailed molecular studies.

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

Regarding the number of animals per group, we will use as few as possible, but as many as needed. Power calculation on our previous data shows that 12 mice per group are needed to obtain sufficient power to assess fasting-refeeding metabolic flexibility differences (measured using indirect calorimetry) induced by a nutritional intervention. For follow-up molecular analyses, e.g. global gene expression analysis, we evaluated the number of samples needed and showed that n=12 is sufficient for nutritional intervention studies to detect significant differences ([REDACTED] et al., [REDACTED]). Since sex differences have shown to significantly affect whole body metabolism and physiology, and therefore also the response to intervention strategies (e.g. van Helden et al., Cell Mol Life Sci 2011), we will select both sexes in our studies, unless prior knowledge suggests otherwise. Regarding the number of groups needed, we aim to reduce the number of groups as much as possible. It is clear that that the setup of a specific animal experiment depends largely on the nutrient being investigated. Together, using this approach we will limit the number of groups in this experiment as much as possible, thus limiting the number of animals needed.

B. The animals

minimum of n=12 per subgroup and 2 concentrations (0 (control), low, high) per nutrient, we will maximally need 864 (432 at PN 432 at end of experiment) animals (as both sexes are analyzed).

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

In this proposed study, we aim to evaluate improvement of metabolic health, which is predominantly of interest for human metabolic health, but might also have its scientific effect on production animals. Also, we aim to unravel molecular modulation of nutrient-induced improvement of metabolic health. For this, analyses in various tissues (including multiple adipose tissues, skeletal muscle and liver) are essential. Since sampling of these tissues is not preferred in humans (for instance using biopsies), we will use animal models in this study. As mice and humans are 99% genetically similar (Gunthar and Dhand, Nature 2002), including most genes associated with disease, mice are widely accepted to be used as experimental model to study human disease. The C57BL/6J mice are recognized to have an eating behavior similar to humans, e.g. overeating on high-fat diet. Therefore, these animals are a good model for research on studies that aim to investigate metabolic health improvement. Because we aim to investigate the effects of nutrient intervention on whole body metabolism and no alternative for such complex integrative processes and organ-organ interactions are available, it is not possible to use an in vitro system, which focuses only on a single individual cell-culture system without inter-organ communication. Prior knowledge of potential effects on individual cell-types might support the choice of nutrients selected to be analyzed in vivo. Based on statistical calculations, animal use will be reduced as much as possible. Our high expertise on studies in mice ensures that we are competent in designing animal studies that require the least amount of animals with the least amount of severity. As such, we have chosen mostly non-invasive but sensitive measures to answer our research questions (refinement). Mice are always housed in their homecage with bedding and cage enrichment (refinement). The methods for body composition analysis (Echo-MRI) and indirect calorimetry are both non-invasive and provide a wealth of data on respectively body composition and whole body energy metabolism. Because these measurements are non-invasive we

are able to perform these measurements at more than one time point within the same animal throughout the study. This limits variation and subsequently increases the power to detect significant differences within our experimental groups in time because of paired data, leading to reduction of animal numbers. In order to study beneficial effects of nutrient intervention and subsequent analyses for optimal dose selection for metabolic health improvement, multiple doses are essential (Slob et al., 2002). Via careful dosing selection based on state-of-the-art data (in house pre-screening data and/or scientific publications) we expect that using only two doses per nutrient (e.g. low and high dose) is suitable. The use of only two dose groups contributes to an important reduction of the animal number in the present study.

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

We have selected sensitive mostly non-invasive measurements that will not cause pain to the animals. The only action that may cause pain is the oral glucose tolerance test, if included. Use of anaesthesia affects blood glucose homeostasis and levels, which is one of the key parameters in this study. Importantly, we analyze beneficial health effects by nutrients, no toxicological effects. Moreover, in our indirect calorimetry system the animals will remain in their own homecage which minimizes stress. Animals will be checked daily by an experienced person to assess their health condition. Based on our animal experimental set-up we do not expect any extreme discomfort (maximal discomfort is moderate due to individual housing). Implementation of new insights in this scientific field of metabolic programming will be used, if applicable, to minimize the duration of the intervention period and thus the individual housing. In any unexpected situation that an animal suffers it will be sacrificed. Humane endpoints will be determined in individual protocols in consultation with the IvD; those include passive behavior not due to obesity, or reduced energy intake leading to loss of lean mass. Environment: No substantial negative effects for the environment are expected.

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.

In nutrition, we are one of the few that extensively and non-invasively measure beneficial health effects of nutrients. Discussions within our international network and at conference meetings provide additional support that our proposed research has not been performed earlier. Per nutrient, a careful literature search is part of the standardized procedure to formulate research questions related to specific nutrients, being unique and not yet published. Our work is novel and thus ensures high impact publications.

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.

Mice will be individually housed as group-housing interferes with the study set-up by not being able to record individual food intake. Offspring mice will be individually housed as soon as they are post-weaning at PN [REDACTED] because it is essential to monitor individual food intake during the experiment, which is not possible if animals are grouped-housed. The mice will get cage enrichment and bedding throughout the study and ad libitum food and water (except for short fasting during indirect calorimetry when a fasting-refeeding challenge is included). In such a challenge, animals will be fasted at day 4 of the indirect calorimetry measurement to ensure similar basal measurements and start values of energy metabolism of the animals. However, this fasting will be performed during the inactive phase of the animals (light phase) when mice normally do not eat; refeeding starts 1 hour prior to the dark, active phase. Therefore this adaptation is not expected to intervene with animal well-being.

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.

H. Pain and pain relief

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

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

The only action that may cause pain is the oral glucose tolerance test, if included in the experiment. Use of anaesthesia affects blood glucose homeostasis and levels, which is one of the key parameters in this study.

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

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Discomfort is caused by experimental approach as described in A. No additional discomfort expected.

Explain why these effects may emerge.

Summary of discomfort: During this proposed study the following discomfort is expected: individual housing, weighing, Echo-MRI, indirect calorimetry, fasting, oral gavage of glucose during oral glucose tolerance test, blood sampling from the tail during OGTT (3x 20 µl in 30 minutes).

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

We aim to minimize the discomfort as much as possible by the following actions: breeding animals at our facility will be used for breeding to prevent buying and transportation of very young mice (interventions start at post-weaning age post-natal day ■■■). Animals can stay in their homecage during the indirect calorimetry measurement, which will prevent stress. During a fasting-refeeding challenge, if applicable in the experiment, animals will be fasted during daytime (light period), during this time span mice normally don't eat, which minimizes potential discomfort. We will combine measures as much as possible, to prevent that animals are disturbed more than needed. For example, at days when weighing and Echo-MRI is scheduled we will do this in one run.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

If animals show less appetite (reduced energy intake), show passive behavior not due to increased obesity, or show erected fur, this will be considered as indications for humane endpoint. Importantly, as a result of our usage of the non-invasive Echo-MRI to measure lean mass and fat mass longitudinally, we will identify compromised health in an early phase, as loss of lean mass is always associated with disease. This is seen in an earlier phase than loss of body weight, so we can monitor in those cases the animals in more detail. Loss of 20% of body weight is considered as an unhealthy situation, although long term caloric restriction leading to an improved health condition, also shows loss of body weight which can reach a similar reduction in body weight (Duivenvoorde et al., J Mol Endo 2011). Moreover, when mice are placed within our indirect calorimetry system we measure continuously physical activity, which also allows us to monitor animals in a highly detailed manner. As in our studies all mice are growing or in adulthood, not being aged nor frail, the 20% body weight loss is calculated from the time-point where body weight changed from an increased or steady state into body weight loss. This is our primary criteria for humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

As we focus on beneficial (metabolic) health effects, we do not expect that animals will suffer from humane endpoints; although the control group will show high fat diet-induced weight gain and likely develop insulin resistance, but this will not further develop into diabetes due to the specific strain of mice used. Nevertheless, we cannot exclude that maybe an animal might become unexpectedly ill not related to the study setup, even though the animals are all at most into their young to middle adult age. Therefore the incidence is considered very low, if at all present.

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 the individual assessments is classified as follows: Individual housing (starting at PN ■■■): moderate Oral gavage of glucose during OGTT: minor Weighing: minor Echo-MRI: minor Indirect calorimetry in home cage: minor Fasting: minor Oral glucose tolerance test (OGTT)(20 µl blood sampling, 3x in 30 minutes): minor We do not expect additional discomfort from the dietary intervention. Our experimental humanized high-fat diet reflects both the human energy% and saturated versus unsaturated fatty acid composition. Also, when we evaluate effects of nutrients these are selected because of their suggested beneficial effects on metabolic health. Collectively, the cumulative severity of the interventions is considered 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.

To evaluate intervention-induced regulation of molecular processes on tissue level, tissues need to be dissected after the intervention. These tissues will be used for detailed molecular analyses, such as gene and protein expression profiling and [REDACTED] activity measurements.

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 3. Longitudinal effects by nutrients in tissue-specific [REDACTED] knockout mice

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

Whole body energy metabolism is at the cellular and molecular level regulated; this regulation underlies the usage of specific nutrients as energy substrates. Mitochondria play a pivotal role in cellular energy metabolism as they are the energy-, ATP-producing cellular organs, and one of its main [REDACTED]. As the metabolic cofactor [REDACTED] has to be bound to the [REDACTED] located [REDACTED] to be functionally active, this shows the highly inter-connectivity of metabolism and regulation of cellular metabolism. [REDACTED] is present in cytoplasm and mitochondria, where it can accept protons (reduction) to become [REDACTED], which subsequently donates the protons (oxidation) to the mitochondrial electron transport chain, representing oxidative phosphorylation, to ultimately produce ATP. As oxidation of carbohydrates and lipids will give rise to a difference in total NADH and FADH, thus also have effects on ratios of mitochondrial NAD/NADH and FAD/FADH, it becomes clear that the [REDACTED] is so closely connected to mitochondrial and cellular metabolism, that those cannot be seen as separate entities. Therefore, fundamental knowledge on this mitochondrial regulation is crucial to understand nutritional effects on metabolic health and flexibility. Indeed, whole body [REDACTED] knockout mice show increased insulin resistance upon a high fat diet challenge [REDACTED] et al., [REDACTED]. We have tissue-specific [REDACTED] knockout mice to investigate on a molecular level the mitochondrial function and regulation in a specific tissue and its contribution to whole body effects, and we will analyze this longitudinally upon a nutritional intervention based on a difference in fat content (exchanged with carbohydrates) to challenge mitochondria continuously.

The experimental approach for characterization of specific (novel) genotypes of [REDACTED] (dys)function will be a two step procedure.

The first step is as follows:

Per genotype: Offspring mice will be stratified by body weight/fat mass after weaning at post-natal day (PN) [REDACTED], of which one subgroup will be sacrificed (Basal group). Two intervention dietary groups will be used next: a low fat healthy diet group, and a humanized high fat adverse diet group. Diets will be provided for [REDACTED] weeks, ad libitum. Water is also available ad libitum. Food intake, body weights and body composition analysis using our non-invasive Echo-MRI will be measured weekly. In week [REDACTED], when mice are [REDACTED] weeks old, a standard oral glucose tolerance test is scheduled.

At the end of the experiment, blood and tissues will be harvested, weighted, snap frozen, and stored at -80°C until further analysis.

As an example for the choice of genotypes: we have the wildtype [REDACTED] mice, which harbor a functional mitochondrial [REDACTED] gene. In contrast, the [REDACTED] mice have a mutation in this [REDACTED] gene, rendering its protein non-functional at whole body level. However, those mice also have other mutations throughout the genome when compared to the [REDACTED] strain, so we constructed this [REDACTED] substrain with and without a functional whole body [REDACTED] gene to study its unique function on the same background. Moreover, we have constructed different tissue-specific [REDACTED] knockout mice. From our breeding colony, we can therefore obtain the wildtype (WT), [REDACTED] [REDACTED] on WT and on [REDACTED] background (double Knockout, DKO). Elucidation of the role of different tissues in whole body metabolism and its molecular cellular and mitochondrial regulation is gaining more and more scientific attention, as it underlies ultimately the complex multi-organ dynamics in energy metabolism. We focus on mitochondrial regulation and dynamics underlying metabolic health.

As a second step, a similar approach is used, which is now extended from week [REDACTED] onwards. Focussing on this time-frame, the control low fat dietary group will continue on the low fat diet for another [REDACTED] weeks, while the subgroup on the high fat diet will be stratified on body weight/fat mass and

subdivided into three separate groups: 1) a subgroup continuing on the high fat diet, 2) a subgroup switched to the low fat diet, and 3) a subgroup receiving a HFD-caloric restricted diet (HFD-CR; adjusted for vitamin and mineral content); this group will receive a 20-30energy% restriction during the █ weeks follow-up. This setup is analogous to previous studies (Duivenvoorde et al., J Mol Endo 2011; Hoevenaars et al., Genes Nutrition 2014) in reduction in energy versus a reduction in fat intake. In week █ a fasting-refeeding challenge test in our indirect calorimetry system will be performed to measure (mitochondrial) metabolic flexibility, and in week █ an oral glucose tolerance test will be performed. Overall, this will result in quantitative measures of █ (dys)function at tissue level and its role on whole body metabolism in a longitudinal manner.

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

From our breeding colony, per genotype, offspring mice are stratified after weaning at PN█. They receive the intervention diets for █ weeks, and food intake, body weight, and body composition analysis is performed weekly. Subsets of mice are sacrificed at start of intervention (PN█) and end of intervention (█ weeks). Food and water are provided ad libitum. In principle, both males and females will be analyzed, as sex-dependent differences in metabolism are potentially present. In week █ an oral glucose tolerance test will be performed. After sacrifice, blood and tissues will be harvested, weighted, snap frozen and stored at -80°C, which will be used for detailed molecular (mitochondrial) studies. In some cases, fresh muscle tissue will be used for direct mitochondrial functional analysis.

In step two, the same procedure is followed, but the experimental setup continues for subsets of mice: the low fat dietary group will continue for another █ weeks, while the high fat dietary group will be stratified and subdivided over subgroups: one subgroup continuing on the high fat diet, one group switching to the low fat diet, and one group receiving the high fat diet in a calorie-restricted manner (20-30% restricted, with adjusted vitamin and minerals to have adequate intake levels). In week █, a fasting-refeeding challenge in our indirect calorimetry system will be performed, and an oral glucose tolerance test in week █.

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

Regarding the number of animals per group, we will use as few as possible, but as many as needed. Power calculation on our previous data shows that 12 mice per group are needed to obtain sufficient power to assess fasting-refeeding metabolic flexibility differences (measured using indirect calorimetry) induced by a nutritional intervention. For follow-up molecular analyses, e.g. global gene expression analysis, we evaluated the number of samples needed and showed that n=12 is sufficient for nutritional intervention studies to detect significant differences (█ et al., █). Since sex differences have shown to significantly affect whole body metabolism and physiology, and therefore also the response to intervention strategies (e.g. van Helden et al., Cell Mol Life Sci 2011), we will select both sexes in our studies, unless prior knowledge suggests otherwise. Together, using this approach we will limit the number of groups in this experiment as much as possible, thus limiting the number of animals needed.

B. The animals

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

In our proposal we discriminate the following groups:

██████████ mice are considered the wildtype background strain mice. Moreover, we will have whole body ██████████ knockout mice on this background (resembling the ██████████ mice but with exact same background as the ██████████ strain), plus additional specific tissue-██████████ knockout mice with and without the functional ██████████ gene. All mice will thus be on the same background of the ██████████ substrain.

We have selected this strain because these mice are sensitive to diet-induced weight gain and insulin resistance when exposed to a western humanized high-fat diet ██████████. Furthermore, the data of this experiment can be compared to available in-house data of our group, as these data are also from the ██████████ or ██████████ strain.

One of our critical parameters is metabolic flexibility (measured using indirect calorimetry in the second step). The exact values used for the calculation below are based on data derived from a study in which biological significance of the intervention was demonstrated, therefore the values used in the power calculations have a solid biological value. The calculation showed that in studies in which effects of dietary interventions on metabolic flexibility are analyzed, at least 12 animals per group are needed to obtain sufficient power (tested one-sided). This was calculated with Java Applet for Power and Sample Size, Lenth R.V., (<http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/power>) using SD1 (SD control group)=252 ml O2/6h, SD2 (SD intervention group)=350 ml O2/6h, True difference of means = 367 ml O2/6h power=0.8.

We also checked for effects on blood glucose levels and an in-house data set showed that using 12 animals gave statistical differences with p-value<0.01 being detected. If we take this latter finding along in our evaluation on optimal animal number per group, n=12 seems appropriate and sufficient. Since we also will perform molecular analyses (to be measured in all genotypes), including global gene expression profiling, we checked the number of animals that are needed for such analyses. Multiple studies ██████████ have shown that for identification of differences the use of 12 animals are optimal. In the publication of ██████████ et al., we describe detailed calculations on basis of group sizes and identification of significantly regulated genes (1000 times random selection of animals (different group sizes) using a data set of 12 animals). The key conclusion of this calculation was that the accepted minimum group size for identification of significant differences on gene expression level is 12 animals/group.

In conclusion, 12 animals per group are essential in the present study in all groups in order to draw reliable conclusions from our data.

Within this animal experiment we plan to evaluate 2 tissues for which we have a tissue-specific ██████████ knockout. With a maximum of n=12 per group to be sacrificed, we will need per genotype a total of 72 animals for step 1 (per sex 12 basal, 12 high fat diet and 12 low fat diet till 12 weeks, so cumulatively for both sexes in total 72 mice). and 168 animals for step 2 (per sex 12 basal, 12 high fat diet and 12 low fat diet at 12 weeks, plus till 21 weeks after the high fat feeding 12 on high fat, 12 on high fat diet restricted, 12 on low fat diet, as well as 12 that continue on the low fat diet from week 12 till 21; cumulatively for both sexes 168 mice). Cumulatively, this is 240 animals per genotype. Analysing 4 genotypes (of a specific tissue) simultaneously, this represents 960 animals. As we will investigate 2 tissues in due time, we will need 1920 animals.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

C. Re-use

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

In this proposed study, we aim to evaluate specific [REDACTED] proteins for their (protective) role in metabolic health, which is predominantly of interest for human metabolic health. Also, we aim to unravel molecular modulation of nutrient-induced alterations by these proteins with a role in metabolic health. For this, analyses in various tissues (primarily focus on multiple [REDACTED] tissues and [REDACTED] are essential. Since sampling of these tissues is not preferred in humans (for instance using biopsies), we will use animal models in this study. As mice and humans are 99% genetically similar (Gunthar and Dhand, Nature 2002), including most genes associated with disease, mice are widely accepted to be used as experimental model to study human disease. The C57BL/6J mice are recognized to have an eating behavior similar to humans, e.g. overeating on high-fat diet. Therefore, these animals are a good model for research on studies that aim to investigate metabolic health improvement. Because we aim to investigate the effects of nutrient intervention on whole body metabolism and no alternative for such complex integrative processes and organ-organ interactions are available, it is not possible to use an in vitro system. Based on statistical power calculations, animal use will be reduced as much as possible. We are competent in designing animal studies that require the least amount of animals with the least amount of severity, and our expertise is (inter)nationally seen. As such, we have chosen mostly non-invasive but sensitive measures to answer our research questions (refinement). Mice are always housed in their homecage with bedding and cage enrichment (refinement). The methods for body composition analysis (Echo-MRI) and indirect calorimetry are both non-invasive and provide a wealth of data on respectively body composition (lean and fat mass) and whole body energy metabolism. Because these measurements are non-invasive we are able to perform these measurements at more than one time point within the same animal throughout the study. This limits variation and subsequently increases the power to detect significant differences within our experimental groups in time because of paired data, leading to reduction of animal numbers. Control animals are for every animal study a necessity, and unfortunately, for peer-reviewed publications more and more reviewers require the control group also not to be published previously in other studies. Therefore, grouping of different studies using the same batch of control animals seems impossible.

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

We have selected sensitive mostly non-invasive measurements that will not cause pain to the animals. Importantly, we analyze beneficial health effects by nutrients, no toxicological effects. Moreover, in our indirect calorimetry system the animals will remain in their own homecage which minimizes stress. For the tissue-specific knockout mice: the whole body [REDACTED] knockout mice are known to have no adverse effects under basal conditions [REDACTED] et al., [REDACTED] et al., [REDACTED]), so we therefore do not expect an increase in adverse effects from the tissue-specific knockout. Indeed, previously reported [REDACTED] specific and [REDACTED]-specific [REDACTED] knockout mice were shown to not manifest any overt metabolic phenotype under either chow or high fat diet conditions [REDACTED] et al., [REDACTED]). Of note, those tissue-specific knockout mice had a different genetic background than the mice in our studies, and we also focus on [REDACTED] knockout mice, for which we do not know what the metabolic effects can be. Animals will be checked daily by an experienced person to assess their health condition. Based on our animal experimental set-up we do not expect any extreme discomfort (maximal severity is moderate). In any unexpected situation that an animal suffers it will be sacrificed. Humane endpoints will be determined in individual protocols in consultation with the IvD. Environment: No substantial negative effects for the environment are expected.

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.

Discussions within our international network and at conference meetings provide support that our proposed research has not been performed earlier. Moreover, we are the first to start using the tissue-specific knockout mice, as well as the mutated [REDACTED] gene on the [REDACTED] background. Our work is novel and thus ensures high impact publications.

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.

Mice will be individually housed as group-housing interferes with the study set-up by not being able to record individual food intake. Offspring mice will be individually housed as soon as they are post-weaning at PN ■■■, because it is essential to monitor individual food intake during the experiment, which is not possible if animals are grouped-housed. The mice will get cage enrichment and bedding throughout the study and in general ad libitum food and water. There are two situations when food availability is restricted: 1) During a short fasting as part of a fasting-refeeding challenge in our indirect calorimetry system. In such a challenge, animals will be fasted at day 4 of the indirect calorimetry measurement to ensure similar basal measurements and start values of energy metabolism of the animals. However, this fasting will be performed during the inactive phase of the animals (light phase) when mice normally do not eat; refeeding starts 1 hour prior to the following dark, active phase. Therefore this adaptation is not expected to intervene with animal well-being. 2) In a step 2 study, where the mice fed a high fat diet for ■ weeks, are subsequently divided into subgroups, of which only one subgroup will continue on a high fat diet-restriction regime at 20-30% restriction for another ■ weeks. This has previously been shown to result in beneficial health effects, even though body weight and adipose tissue mass decreases (Duivenvoorde et al., J Mol Endo 2011; Hoevenaars et al., Genes Nutrition 2014).

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.

The only action that may cause pain is the oral glucose tolerance test. Use of anaesthesia affects blood glucose homeostasis and levels, which is one of the key parameters in this study.

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?

Summary of discomfort: During this proposed study the following discomfort is expected: individual housing, oral gavage, weighing, Echo-MRI, indirect calorimetry (only step 2), fasting, blood sampling from tail during oral glucose tolerance test (3x 20 µl in 30 minutes). It is described that [REDACTED] whole body knockout mice are sensitized to high fat diet-induced obesity, insulin resistance, hyperlipidemia and steatohepatitis ([REDACTED] et al., [REDACTED] while [REDACTED]-specific [REDACTED] knockout mice showed no effects on these parameters ([REDACTED] et al., [REDACTED]). Of note, those mice were on a slightly different background strain than the tissue-specific [REDACTED] mice we have, which might show small differences in metabolic regulation.

Explain why these effects may emerge.

Discomfort is caused by experimental approach as described in A. No additional discomfort expected.

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

We aim to minimize the discomfort as much as possible by the following actions: Offspring animals are individually housed after weaning (PN [REDACTED]) when nutritional intervention period starts. They stay in their homecage during the indirect calorimetry measurement, which will prevent stress. Animals will be fasted during daytime (light period), during this time span mice normally don't eat, which minimizes potential discomfort. We will combine measures as much as possible, to prevent that animals are disturbed more than needed. For example, at days when weighing and Echo-MRI is scheduled we will do this in one run.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

If animals show less appetite (reduced energy intake), show passive behavior not due to increased obesity, or show erected fur, this will be considered as indications for humane endpoint. Importantly, as a result of our usage of the non-invasive Echo-MRI to measure lean mass and fat mass longitudinally, we will identify compromised health in an early phase, as loss of lean mass is always associated with disease. This is seen in an earlier phase than loss of body weight, so we can monitor in those cases the animals in more detail. Loss of 20% of body weight is considered as an unhealthy situation, although long term caloric restriction leading to an improved health condition, also shows loss of body weight which can reach a similar reduction in body weight (Duivenvoorde et al., J Mol Endo 2011). Moreover, when mice are placed within our indirect calorimetry system we measure continuously physical activity, which also allows us to monitor animals in a highly detailed manner. As in our studies all mice are growing or in adulthood, not being aged nor frail, the 20% body weight loss is calculated from the time-point where body weight changed from an increased or steady state into body weight loss. This is our primary criteria for humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

As we focus on metabolic health effects, we do not expect that animals will suffer from humane endpoints induced by the nutritional intervention. Nevertheless, we cannot exclude that maybe an animal might become unexpectedly ill not related to the study setup, like development of elephant teeth, even though the animals are all at most into their young to middle adult age. Therefore the incidence is considered very low, if at all present. We observed in our recent studies 1 mouse out of ~ 400 mice (0.25%) development of elephant teeth.

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 the individual assessments is classified as follows: Individual housing: moderate Weighing: minor Echo-MRI: minor Indirect calorimetry in home cage: minor Fasting: minor Blood sampling from tail during Oral glucose tolerance test (OGTT)(20 µl, 3x in 30 minutes): minor We do not expect additional discomfort from the dietary intervention. Our experimental high-fat diet reflects both the human energy% and saturated versus unsaturated fatty acid composition. The high-fat diet restricted subgroup receives food restricted, but this results in beneficial health effects, and we therefore classify this as minor discomfort. Collectively, the cumulative discomfort of the interventions (in total, n=768) is considered moderate. OF NOTE: Animals in the basal groups (sacrificed at PN■, in total n=192) will be sacrificed before the start of the intervention. These animals will only experience discomfort from determination of body weight and body composition. The total discomfort of basal groups is therefore minor.

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.

To evaluate intervention-induced regulation of molecular processes on tissue level, tissues need to be dissected after the intervention. These tissues will be used for detailed molecular analyses, such as gene and protein expression profiling and mitochondrial activity measurements.

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="1355 880 1697 904">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="622 912 640 936">4</td> <td data-bbox="1355 912 2022 968">4. Dose effects – interactions on metabolic health and flexibility: focus on ██████████</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	4	4. Dose effects – interactions on metabolic health and flexibility: focus on ██████████
Serial number	Type of animal procedure					
4	4. Dose effects – interactions on metabolic health and flexibility: focus on ██████████					

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 experimental approach of this category 4 study resembles a category 1 experimental approach, although some minor, but important, differences exist. Therefore, we classified this category 4 study as 'Dose effects'. A category 4 study will primarily be used for investigation of [REDACTED] or [REDACTED]

Offspring mice will receive from weaning at PN [REDACTED] onward for three weeks the reference diet for [REDACTED] weeks, whereafter mice are stratified by body weight/fat mass. Next, groups receive the different intervention diet(s) versus appropriate control diet(s). The intervention period lasts for [REDACTED] [REDACTED] and food intake and body weights will be measured weekly. Body composition analysis using our non-invasive Echo-MRI is performed on a (bi)weekly schedule. In general, a study will contain a control diet (e.g. low fat diet), a control diet + bioactive compound, an adverse diet (e.g. high fat diet) and an adverse diet + bioactive compound at same dose as provided to the low fat diet group. Alternatively, the control diet is provided, and the intervention groups receive the same control diet with added bioactive compound (e.g. [REDACTED]) in 3 different doses, or the same dose of this specific bioactive compound and another dietary alteration (e.g. higher [REDACTED], different [REDACTED] but at same energy % derived from fats). We showed previously that a difference in fat content, but in the same amount, of the diet has a clear effect on metabolic flexibility [REDACTED] et al., [REDACTED]), which might be enhanced by the addition of a specific [REDACTED]. Selection will be based on prior knowledge of peer-reviewed publications or as of yet unpublished data of our own group, and levels will be in the physiological, not toxicological range.

At the end of the intervention period, indirect calorimetry measurements are scheduled for detailed analysis of basal whole body energy expenditure and substrate usage, physical activity, and metabolic flexibility using a fasting-refeeding challenge test in our indirect calorimetry system. Therefore, mice will remain in the indirect calorimetry system for up to 5-7 days, depending on in- or exclusion of the challenge test. Moreover, if we use [REDACTED] for refeeding, we are capable to measure [REDACTED] the substrate usage by [REDACTED] in the indirect calorimetry system. For instance usage of [REDACTED] from [REDACTED] in stead of [REDACTED] already generates enough discrimination for such an analysis. Alternatively, when [REDACTED] like [REDACTED] or [REDACTED] are used, a single oral gavage is needed. Mice will have ad libitum access to food and water throughout the whole study period.

At the end of the experiment, animals are sacrificed and blood and tissues will be harvested, weighted, snap frozen, and stored at -80°C until further analysis.

We aim to study beneficial effects of nutrient interventions, not toxicity, therefore the dose will not cause any additional discomfort. It is common to select two-three doses and in all situations, dose selection will be discussed with the IvD.

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

From our breeding-pairs, offspring mice will be distributed over standardized nests with similar ratio of males/females. After weaning, they receive for [REDACTED] weeks the standard reference diet ad libitum and are at the end stratified by body weight/fat mass and distributed over the different

intervention groups. Intervention diets are provided for [REDACTED] weeks ad libitum. Water is always available ad libitum. At the end of the intervention period, our integrative test phase using our non-invasive indirect calorimetry system is key in this experiment. This benefits animal welfare (e.g. principally non-invasive measurements are used and the period with maximal discomfort (moderate) is as short as possible with maximal effectiveness in terms of effect). In principle, both males and females will be analyzed, as sex-dependent differences in metabolism are potentially present. For instance, it is well described for beta-carotene that males show complete opposite effects compared to females at the molecular level (van Helden et al., Cell Mol Life Sci 2011). If it is known from literature to be absent, we might select otherwise for a specific nutrient or bioactive compound.

Indirect calorimetry measurements include whole body energy expenditure, substrate usage, and total activity continuously and in real-time mode measured. Moreover, both water and food intake are recorded real-time. The mice will remain in their home cage with bedding for this assessment, which lasts up to 5-7 days in case a challenge test is included. As an example, for the metabolic flexibility assessment, the mice will be fasted during the inactive light phase and re-fed prior to the following active dark phase. The metabolic response to refeeding will be assessed in the indirect calorimetry system, and we have shown that such a fasting-refeeding response is a sensitive measure to assess metabolic flexibility [REDACTED] et al., [REDACTED]

Nutritional bioactive responses are mostly expected in the later stage, and therefore we will measure whole body energy expenditure and metabolic flexibility only once at the end of the study.

To measure the animal response to the indirect calorimetry measurements we will assess body weight and body composition before and after this measurement to be able to adjust energy expenditure based on lean mass, if different. At the end of the experiment, animals are sacrificed and blood and tissues will be harvested, weighted, snap frozen and stored at -80°C, which will be used for detailed molecular studies.

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

Regarding the number of animals per group for this category 4 study, we align this to the category 2 studies.

We will use as few as possible, but as many as needed. Power calculation on our previous data shows that 12 mice per group are needed to obtain sufficient power to assess fasting-refeeding metabolic flexibility differences (measured using indirect calorimetry) induced by a nutritional intervention. For follow-up molecular analyses, e.g. global gene expression analysis, we evaluated the number of samples needed and showed that n=12 is sufficient for nutritional intervention studies to detect significant differences ([REDACTED] et al., [REDACTED]). Since sex differences have shown to significantly affect whole body metabolism and physiology, and therefore also the response to intervention strategies (e.g. van Helden et al., Cell Mol Life Sci 2011), we will select both sexes in our studies, unless prior knowledge suggests otherwise.

Regarding the number of groups needed, we aim to reduce the number of groups as much as possible. It is clear that that the setup of a specific animal experiment depends largely on the nutrient being investigated. If we are aware of the existence of a positive control compound, a positive control group is added, but as said, this largely depends on the choice of nutrient investigated.

Together, using this approach we will limit the number of groups in this experiment as much as possible, thus limiting the number of animals needed.

B. The animals

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

As the set-up of this type of experimentation (category 4, see 3.2 of overall description of full application) resembles the experimental setup for direct nutritional effects on metabolic health and flexibility (category 1 experimentation), it follows the same choices and justification of animals.

In our proposal we discriminate the following groups:

Control group(s): animals that receive 0 mg/kg of nutrient (negative control) and run parallel to our intervention groups (e.g. different dose groups, or the low fat and high fat dietary groups). These animals are essential to determine nutrient-mediated effect on studied parameters.

For all these groups: Section is at the end of the nutrient intervention period, and all measures will be identical in the groups.

██████████ mice will be used for breeding and offspring for the animal experiment. We have selected this strain because these mice are sensitive to diet-induced weight gain and insulin resistance when exposed to a western high-fat diet ██████████. Furthermore, the data of this experiment can be compared to available in-house data of our group, as these data is also from the ██████████ strain.

The power calculation for measurements in metabolic flexibility showed that at least 12 animals per group are needed to obtain sufficient power (tested one-sided). This was calculated with Java Applet for Power and Sample Size, Lenth R.V., (<http://homepage.stat.uiowa.edu/~rlenth/power>) using SD1 (SD control group)=252 ml O₂/6h, SD2 (SD intervention group)=350 ml O₂/6h, True difference of means = 367 ml O₂/6h power=0.8. We also checked for relevant effects on blood glucose levels and an in-house data set showed that using 12 animals gave statistical differences with p-value<0.01 being detected. If we take this latter finding along in our evaluation on optimal animal number per group, n=12 seems appropriate and sufficient. Since we also will perform molecular analyses (to be measured in all groups), including global gene expression profiling, we evaluated the number of animals that are needed for such analyses. Multiple studies (██████████) have shown that for identification of differences the use of 12 animals are optimal. In the publication of ██████████ et al., we describe detailed calculations on basis of group sizes and identification of significantly regulated genes (1000 times random selection of animals (different group sizes) using a data set of 12 animals). The key conclusion of this calculation was that the accepted minimum group size for identification of relevant, significant differences on gene expression level is 12 animals/group.

In conclusion, 12 animals per group are essential in the present study in all groups in order to draw reliable conclusions from our data.

Within this animal experiment we plan to evaluate maximal 10 nutrients/bioactives for their direct modulatory effects on metabolic health; selection of nutrients is part of several PhD-projects in coming years. Independent of the exact study setup (control low fat and high fat diet, without and with bioactive versus setup of control diet and up to 3 doses of single bioactive), we need 4 groups per study, so 4*12 (animals)*2 (males and females) * 10 (different nutrients/bioactives) = maximally 960 animals.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

In line with category 1 studies, here, in this proposed study, we aim to evaluate improvement of metabolic health, which is predominantly of interest for human metabolic health, but might also have its scientific effect on production animals. Also, we aim to unravel molecular modulation of nutrient-induced improvement of metabolic health. For this, analyses in various tissues (including multiple adipose tissues, skeletal muscle and liver) are essential. Since sampling of these tissues is not preferred in humans (for instance using biopsies), we will use animal models in this study. As mice and humans are 99% genetically similar (Gunthar and Dhand, Nature 2002), including most genes associated with disease, mice are widely accepted to be used as experimental model to study human disease. The C57BL/6J mice are recognized to have an eating behaviour similar to humans, e.g. overeating on high-fat diet. Therefore, these animals are a good model for research on studies that aim to investigate metabolic health improvement. Because we aim to investigate the effects of nutrient intervention on whole body metabolism and no alternative for such complex integrative processes and organ-organ interactions are available, it is not possible to use an in vitro system. Based on statistical calculations, animal use will be reduced as much as possible. Our high expertise on studies in mice and strong track-record in this field ensures that we are competent in designing animal studies that require the least amount of animals with the least amount of severity. As such, we have chosen mostly non-invasive but sensitive measures to answer our research questions (refinement). Mice are always housed in their homecage with bedding and cage enrichment (refinement). The methods for body composition analysis (Echo-MRI) and indirect calorimetry are both non-invasive and provide a wealth of data on respectively body composition and whole body energy metabolism. Because these measurements are non-invasive we are able to perform these measurements at more than one time point within the same animal throughout the study. This limits variation and subsequently increases the power to detect significant differences within our experimental groups in time because of paired data, leading to reduction of animal numbers. In order to study beneficial effects of nutrient intervention and subsequent analyses for optimal dose selection for metabolic health improvement, multiple doses are essential (Slob et al., 2002). Via careful dosing selection based on state-of-the-art data (in house pre-screening data and/or scientific publications) we expect that using only two to three doses per nutrient is suitable. The use of only a low number of dose groups contributes to an important reduction of the animal number in the present study.

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

We have selected sensitive mostly non-invasive measurements that will not cause pain to the animals. Importantly, we analyze beneficial health effects by nutrients, no toxicological effects. Moreover, in our indirect calorimetry system the animals will remain in their own homecage which minimizes stress. Animals will be checked daily by an experienced person to assess their health condition. Based on our animal experimental set-up we do not expect any extreme discomfort (maximal severity is moderate due to individual housing). In any unexpected situation that an animal suffers it will be sacrificed. Humane endpoints will be determined in individual protocols in consultation with the IvD. Environment: No substantial negative effects for the environment are expected.

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.

Discussions within our international network and at conference meetings provide support that our proposed research has not been performed earlier. Per nutrient or bioactive, a careful literature search is part of the standardized procedure to formulate research questions related to specific nutrients/bioactives, being unique and not yet published. Our work is novel and thus ensures high impact publications.

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.

Mice will be individually housed as group-housing interferes with the study set-up by not being able to record individual food intake. Offspring mice will be individually housed as soon as they are post-weaning at PN [REDACTED], because it is essential to monitor individual food intake during the experiment, which is not possible if animals are grouped-housed. The first [REDACTED] weeks of the post-weaning period are used as control phase and by individual housing we reduce variation in food intake due to social aspects. The mice will get cage enrichment and bedding throughout the study and ad libitum food and water (except for short fasting during indirect calorimetry when a fasting-refeeding challenge is included). In such a challenge, animals will be fasted at day 4 of the indirect calorimetry measurement to ensure similar basal measurements and start values of energy metabolism of the

animals. However, this fasting will be performed during the inactive phase of the animals (light phase) when mice normally do not eat; refeeding starts 1 hour prior to the dark, active phase. Therefore this adaptation is not expected to intervene with animal well-being.

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.

As we do not expect pain to be present for the animals, we neither need to relief 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?

Summary of discomfort: During this proposed study the following discomfort is expected: individual housing, weighing, Echo-MRI, indirect calorimetry, and fasting as part of the fast-refeeding challenge. All diets will contain appropriate levels of essential dietary compounds, thus not inducing additional discomfort.

Explain why these effects may emerge.

Discomfort is caused by experimental approach as described in A. No additional discomfort expected.

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

We aim to minimize the discomfort as much as possible by the following actions: animals are group housed until fully weaned, followed by stratification and intervention group assignment. From that point onward, mice are housed individually to measure individual food intake. Animals can stay in their homecage during the indirect calorimetry measurement, which will prevent stress. Animals will be fasted during daytime (light period), during this time span mice normally don't eat, which minimizes potential discomfort. We will combine measures as much as possible, to prevent that animals are disturbed more than needed. For example, at days when weighing and Echo-MRI is scheduled we will do this in one run.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

If animals show less appetite (reduced energy intake), show passive behavior not due to increased obesity, or show erected fur, this will be considered as indications for humane endpoint. Importantly, as a result of our usage of the non-invasive Echo-MRI to measure lean mass and fat mass longitudinally, we will identify compromised health in an early phase, as loss of lean mass is always associated with disease. This is seen in an earlier phase than loss of body weight, so we can monitor in those cases the animals in more detail. Loss of 20% of body weight is considered as an unhealthy situation, although long term caloric restriction leading to an improved health condition, also shows loss of body weight which can reach a similar reduction in body weight (Duivenvoorde et al., J Mol Endo 2011). Moreover, when mice are placed within our indirect calorimetry system we measure continuously physical activity, which also allows us to monitor animals in a highly detailed manner. As in our studies all mice are growing or in adulthood, not being aged nor frail, the 20% body weight loss is calculated from the time-point where body weight changed from an increased or steady state into body weight loss. This is our primary criteria for humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

As we focus on beneficial (metabolic) health effects, we do not expect that animals will suffer from humane endpoints. Nevertheless, we cannot exclude that maybe an animal might become unexpectedly ill not related to the study setup, like development of elephant teeth, even though the animals are all at most into their young to middle adult age. Therefore the incidence is considered very low, if at all present.

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 the individual assessments is classified as follows: Individual housing: moderate Weighing: minor Echo-MRI: minor Indirect calorimetry in home cage: minor Fasting: minor We do not expect additional discomfort from the dietary intervention. Our experimental high-fat diet reflects both the human energy% and saturated versus unsaturated fatty acid composition. Also, when we evaluate effects of bioactives or nutrients these are selected because of their suggested beneficial effects on metabolic health. Collectively, the cumulative severity of the interventions is considered 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.

To evaluate intervention-induced regulation of molecular processes on tissue level, tissues need to be dissected after sacrifice of the animals at the end of the intervention. These tissues will be used for detailed molecular analyses, such as gene and protein expression profiling and [REDACTED] activity measurements.

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>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>5</td><td>5. ██████████ to investigate non-invasive ██████████</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	5	5. ██████████ to investigate non-invasive ██████████
Serial number	Type of animal procedure					
5	5. ██████████ to investigate non-invasive ██████████					

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.

Here, we will use [REDACTED] to investigate [REDACTED] of specific [REDACTED]. This is performed by providing mice a specific food as regular food, or a nutrient by gavage. In both cases, the food or the nutrient is [REDACTED], being a safe, [REDACTED]. Examples of such nutrients are [REDACTED] or [REDACTED], while also corn starch versus wheat starch can be used, as [REDACTED] contains also [REDACTED]. In nature, [REDACTED] is normally and in the majority present as [REDACTED], while a very small amount is present as its [REDACTED]. In our indirect calorimetry system, we have [REDACTED], so we can sensitively and in real-time mode measure [REDACTED]. Using this technique, we are capable to determine [REDACTED] whole body [REDACTED] of e.g. [REDACTED] provided, and after sacrifice, tissue samples will also be used to determine [REDACTED] of [REDACTED] to investigate [REDACTED] of e.g. [REDACTED] or [REDACTED] derived from [REDACTED] into [REDACTED]. By doing so, we can perform [REDACTED] analyses, which largely depend on metabolic settings, which cumulatively help us to unravel underlying mechanisms. Besides these animal studies, [REDACTED] to measure only [REDACTED] rates are also part of category 1, 2 or 4 studies as described in appendices 1, 2 and 4. In these latter cases, a single bolus (nutrient or meal) is given and [REDACTED] is measured in indirect calorimetry system without killing the animal.

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

Mice will be fed e.g. [REDACTED] diets as part of their regular diets, or alternatively, can be fed a single meal comparable to a single meal test as challenge test. When done in our indirect calorimetry system, we sensitively measure [REDACTED] the [REDACTED] of this single [REDACTED] by the [REDACTED]. Likewise, when we perform an oral glucose tolerance test by oral gavage of glucose, we are able to [REDACTED] part of the [REDACTED] by [REDACTED] and measure thereafter [REDACTED] of the [REDACTED] in the indirect calorimetry system. Moreover, after sacrifice (even after an extensive period) we are able to measure remaining [REDACTED] as [REDACTED] or even [REDACTED] or [REDACTED]. Simply said, mice will be fasted for 5 hours in the inactive light phase, whereafter they receive the single meal or [REDACTED] by gavage. Following breath analysis using our indirect calorimetry system is a non-invasive method to measure adequate [REDACTED].

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

Pilot studies using [REDACTED], as part of the [REDACTED] given to young adult and middle aged male wildtype [REDACTED] mice, representing two age groups with a difference in metabolic flexibility as published [REDACTED] et al., [REDACTED], showed us that using minimally n=12 provides enough power to detect significant differences. Moreover, we also performed a pilot study using a [REDACTED] meal test [REDACTED] versus [REDACTED] component in the diet), which has much lower levels of [REDACTED], but again, results indicated that with minimal n=12 we will have enough statistical power to detect significant differences. Fortunately, if a tracer study is part of a category 1,2, or 4 study, those groups of mice also are based on n=12 and we are thus confident to detect significant differences based on the [REDACTED] of exhaled air, using our indirect calorimetry system.

B. The animals

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

Animals will be of the murine C57BL/6J strains, either with a functional [REDACTED] gene or the mutated [REDACTED] as present in the [REDACTED]

[REDACTED]
These mouse strains are sensitive to diet-induced overweight and obesity development, in conjunction with insulin resistance. This offers unique opportunities for non-invasive nutrient flux analysis under different metabolic situations.

Per study, we will use 12 animals per group and two groups will be compared. For example, [REDACTED] versus [REDACTED] will be compared, or [REDACTED] versus [REDACTED] (with differences in [REDACTED]). As sex differences are reported in metabolic studies (e.g. Van Helden et al., Cell Mol Life Sci 2011), we will analyze both males and females. Overall, ten such studies will be performed in the coming years, all as part of multiple ongoing PhD projects. Examples of those projects focus on different types of [REDACTED], different [REDACTED] and [REDACTED] [REDACTED] on [REDACTED] digestion. Animals will be of young adult age. As supportive data for the observed differences in e.g. oxidation levels of the [REDACTED], we will apply transcriptomics on selected tissues, for which we evaluated the number of animals that are needed for such analyses. Multiple studies [REDACTED] have shown that for identification of differences the use of 12 animals are optimal. In the publication of [REDACTED] et al., we describe detailed calculations on basis of group sizes and identification of significantly regulated genes (1000 times random selection of animals (different group sizes) using a data set of 12 animals). The key conclusion of this calculation was that the accepted minimum group size for identification of relevant, significant differences on gene expression level is 12 animals/group.

After the first two studies, focusing on [REDACTED], an interim report can be discussed before continuation with the [REDACTED].

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

We will use as minimum number of animals as possible, and only scarcely use [REDACTED] for detailed tissue analysis. [REDACTED] whole body [REDACTED] using [REDACTED] is scheduled to be part of a category 1, 2 or 4 animal study (see appendices 1, 2 and 4). These [REDACTED] are minimally invasive, and only depend on the way how the nutrient or diet is provided to the animals: by oral gavage (e.g. [REDACTED] or [REDACTED] or as pelleted food having no invasive aspect. As we investigate whole body physiology, we cannot perform those studies in vitro by cell culture studies, and especially communication between organs is crucial for the way how an animal handles a specific nutrient.

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

[REDACTED] or test meal will be given prior to the dark phase when animals are active and start eating much more than during their inactive light phase. No other adverse effects are expected.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

A scientific literature search is a standard procedure to support defining a scientific research question for which a single tracer test is needed. To our knowledge, we are the first to have [REDACTED] indirect calorimetry system to detect e.g. [REDACTED] during mouse studies quantitatively and in real-time mode.

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.

Animals are housed individually, especially when they are in the indirect calorimetry system in order to quantify food/nutrient intake at individual level, and more importantly, the individual whole body [REDACTED] levels based on [REDACTED].

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?

H. Pain and pain relief

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

Potential pain is induced by oral gavage only. Use of anaesthetics is impossible as this increases blood glucose levels which interferes with measures of [REDACTED] when [REDACTED] or [REDACTED] are 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?

Mice will be individually housed, with bedding and cage enrichment. No additional adverse effects on welfare are expected by a single test meal challenge or [REDACTED]

Explain why these effects may emerge.

n.a.

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

Gavage is always performed by experienced personnel. Mice are housed in the indirect calorimetry system, which allows the researchers to sensitively measure welfare based on oxygen consumption and carbondioxide production. It is well known that stress induces increased glucose oxidation levels which is one of the parameters being continuously measured in the indirect calorimetry system.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

If animals show less appetite (reduced energy intake), show passive behavior not due to increased obesity, or show erected fur, this will be considered as indications for humane endpoint. Importantly, as a result of our usage of the non-invasive Echo-MRI to measure lean mass and fat mass longitudinally, we will identify compromised health in an early phase, as loss of lean mass is always associated with disease; if only a single dose by gavage is given or a 5-day study is executed it will be likely that such conditions will most likely not take place. A decrease in fat mass is seen in an earlier phase than loss of body weight, so we can monitor in those cases the animals in more detail. Loss of 20% of body weight is considered as an unhealthy situation, although long term caloric restriction leading to an improved health condition, also shows loss of body weight which can reach a similar reduction in body weight (Duivenvoorde et al., J Mol Endo 2011). Moreover, when mice are placed within our indirect calorimetry system we measure continuously physical activity, which also allows us to monitor animals in a highly detailed manner. As in our studies all mice are growing or in adulthood, not being aged nor frail, the 20% body weight loss is calculated from the time-point where body weight changed from an increased or steady state into body weight loss. This is our primary criteria for humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

As we focus on beneficial (metabolic) health effects, we do not expect that animals will suffer from humane endpoints. Nevertheless, we cannot exclude that maybe an animal might become unexpectedly ill not related to the study setup, like development of elephant teeth, even though the animals are all at most into their young to middle adult age and the study duration is short. Therefore the incidence is considered very low, if at all present.

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).

Individual housing: moderate. As the oral gavage and measures in indirect calorimetry system are both minor, the cumulative classification is 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.

L. Method of killing

At the end of a [REDACTED], animals are sacrificed in order to measure tissue content of [REDACTED]. For instance, when [REDACTED] is provided, the [REDACTED] will be partly [REDACTED], and partly [REDACTED] into mainly either [REDACTED] or [REDACTED] which are [REDACTED] into [REDACTED]

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

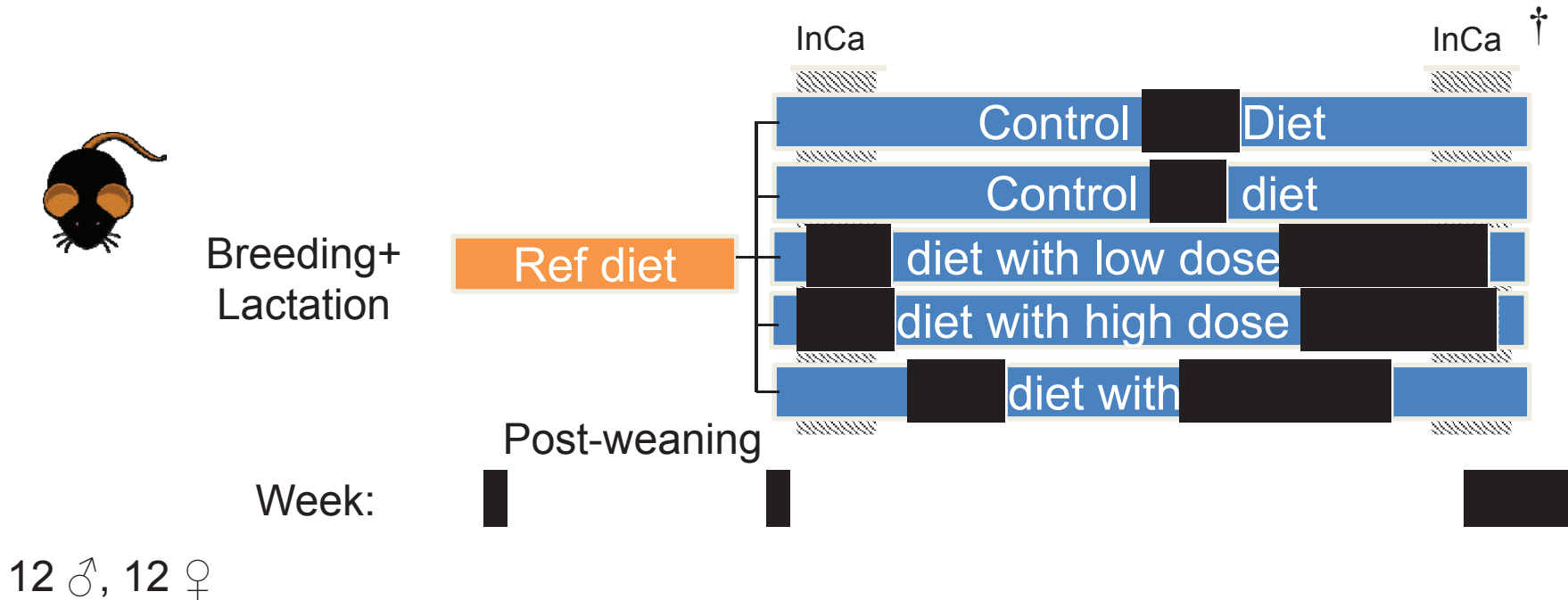
CCD application 2017.W-0024

Nutritional Physiology and Metabolic Health



Appendix 1: Direct nutritional effects on metabolic health and flexibility

This is detailed diagram for first study using Appendix 1 setup

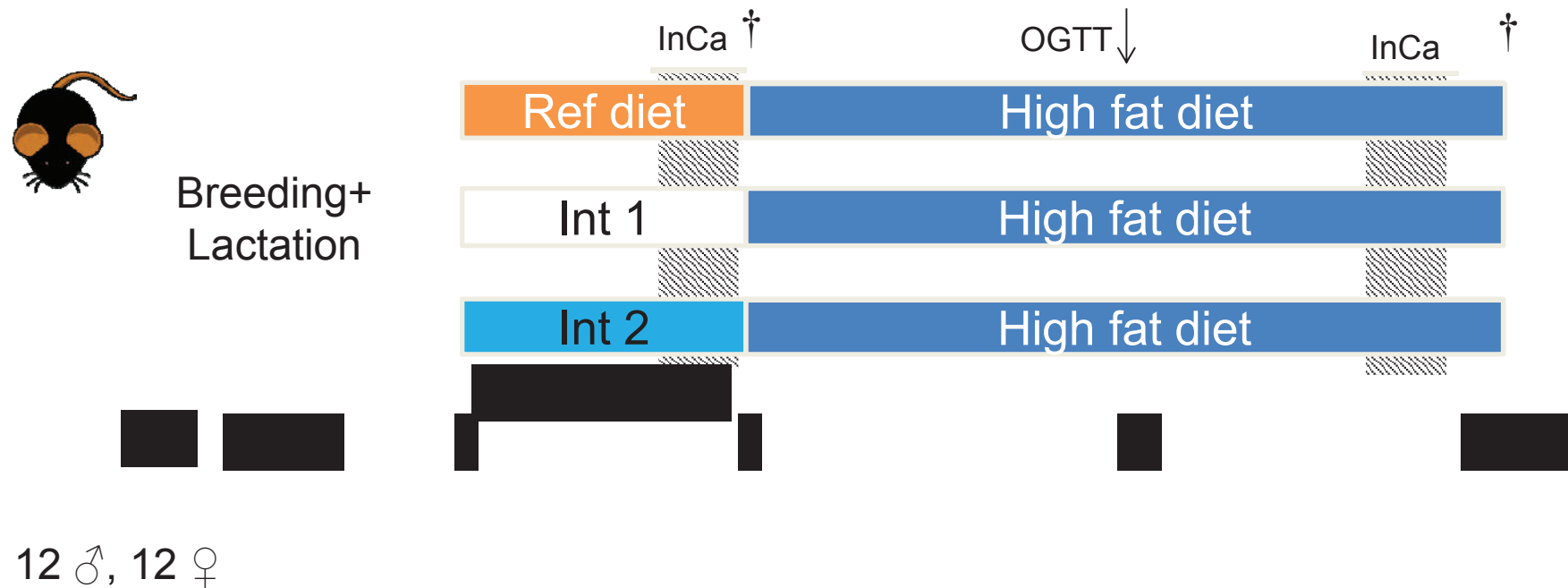


InCa= Indirect Calorimetry, including a challenge like fasting-refeeding

†: section of mice for detailed molecular analyses

█-week Intervention diets : based on AIN93-G with ~20en% protein. █ is a pharmaceutical drug and is used as a positive control to show █ reflecting █. To enhance detection of █ of █, we will make use of our █ in the InCa system. █ and █ levels will be based on previous published mouse studies. This set-up is foreseen for in total 3 nutrients, while a set-up with only 2, not 3, control groups will be used for another 3 nutrients.

Appendix 2: Metabolic programming effects of metabolic health and flexibility



InCa= Indirect Calorimetry, including a fasting-refeeding challenge (with or without [redacted])

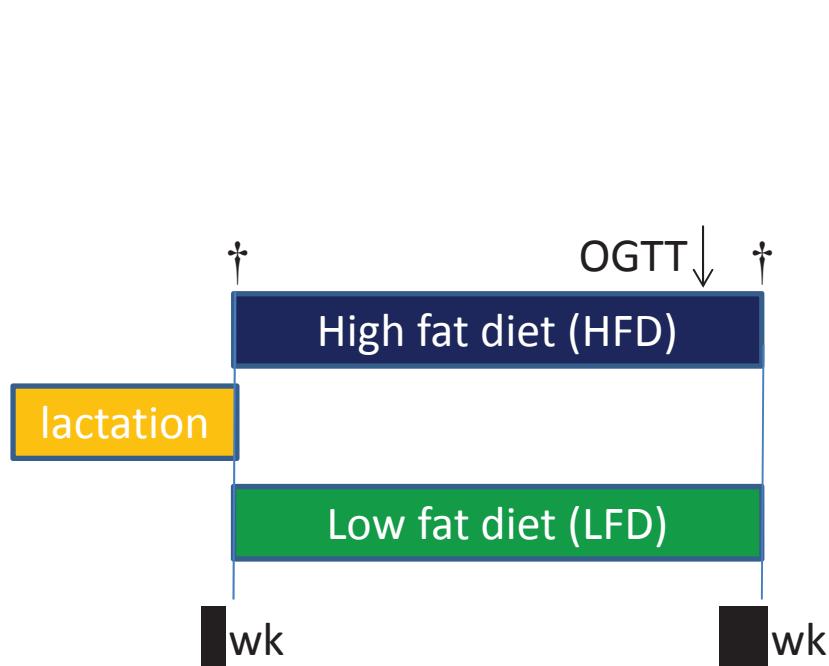
† : section of subset of mice for detailed molecular analyses

Int: intervention diet given [redacted]

[redacted]-week Intervention diets (en%): based on AIN93-G

Carbohydrate- and fat- amount and composition will depend on research question, but will always be based on physiological levels.

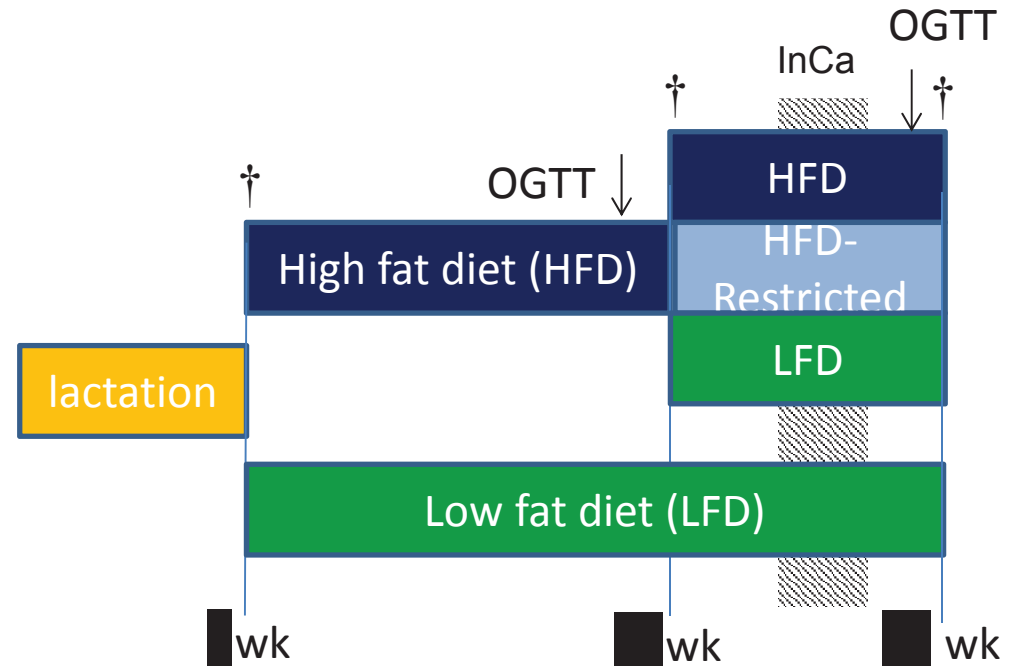
Appendix 3: Longitudinal effects by nutrients in tissue-specific
 [redacted] knockout mice



n=12 per group per genotype and per sex

Set-up 1.

OGTT = oral glucose tolerance test, week [redacted]
 †: section of (subset of) mice for detailed molecular analyses

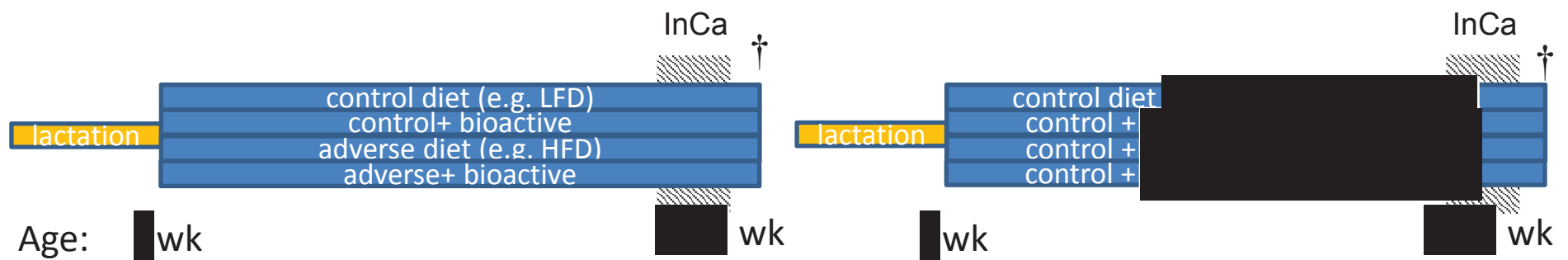


n=12 per group per genotype and per sex

Set-up 2.

OGTT = oral glucose tolerance test, weeks [redacted] and [redacted]
 InCa= Indirect Calorimetry, including a fasting-refeeding challenge (with or without [redacted])
 † : section of (subset of) mice for detailed molecular analyses

Appendix 4: Dose effects – interactions on metabolic health and flexibility: focus on [REDACTED]



InCa= Indirect Calorimetry, including a fasting-refeeding challenge (with or without [REDACTED]), 1 week before sacrifice

OGTT = oral glucose tolerance test, week [REDACTED]

†: section of mice for detailed molecular analyses

[REDACTED] can either be a different concentration, a different [REDACTED] or [REDACTED] 1 plus other variation in the diet (e.g. higher [REDACTED] different [REDACTED])

[REDACTED] because the [REDACTED] is [REDACTED]

[REDACTED] may also be a [REDACTED] for example.

Overview of total animals requested for all studies

studie	n per subgroup	basal group	intermediate group	end group	total groups	genotypes	sex (1 or 2)	nutrients	tissues-KO	total:
1. direct effects	12	0	0	4.5	4.5	1	2	6	0	648
2. programming effects	12	0	3	3	6	1	2	6	0	864
3. longitudinal effects	12	2	2	6	10	4	2	1	2	1920
4. dose-effects	12	0		4	4	1	2	10	0	960
5. [REDACTED] effects	12	0		2	2	1	2	10	0	480
								Overall total:		4872
	total basal animals:	192								
	% basal:	3.9% of overall total								

5. [REDACTED]:

Mice are kept within our indirect calorimetry system for adaptation for 24 hours, followed by basal measurements for 24-48 hours.

Thereafter, they receive a fasting-refeeding challenge by refeeding them a meal [REDACTED] via oral gavage.

In all these cases, a [REDACTED] is [REDACTED] thus enabling us to measure [REDACTED] and investigate [REDACTED]

Mice are killed subsequently, allowing us to study

- 1) tissue distribution of [REDACTED]
- 2) [REDACTED] by molecular analysis of [REDACTED] including [REDACTED] including [REDACTED] and [REDACTED]s, etc.

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD1040020171668**
2. Titel van het project: Nutritional Physiology and Metabolic Health in human, mouse as a model
3. Titel van de NTS: Voedingsfysiologie en Metabole Gezondheid in muis als model voor de mens
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
DEC-WUR
[REDACTED]
Secretaris: dec@wur.nl
6. Adviestraject
Ontvangen door DEC: (CCD in:) 12-05-2017
Aanvraag compleet: ja
In vergadering besproken: 15-05-2017 (De DEC had de stukken informeel al ontvangen op 04-05-2017)
Anderszins behandeld: n.v.t.
Termijnonderbreking(en) van 19-05-2017 tot 02-06-2017 en van 12-06-2017 tot 13-06-2017
Besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen: n.v.t.
Aanpassing aanvraag: 02-06-2017, 08-08-2017 en 13-06-2017
Advies aan CCD: 21-06-2017
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: 19-05-2017, 08-06-2017 resp. 12-06-2017
Datum antwoord: 02-06-2017, 08-06-2017, resp. 13-06-2017 (redactioneel)
Gestelde vragen en antwoorden:
De DEC verzoekt u bij 3.4., mede met het oog op mogelijke vermindering, toe te lichten waarom de dierproeven van type 1 en 2 niet kunnen worden gecombineerd in een appendix (een voedingsinterventieproef waarbij soms wel en soms niet een OGTT wordt uitgevoerd en soms wel en soms niet individueel wordt gemeten).
A category 1 study investigates the direct effects of a nutrient during and following the intervention period of [REDACTED] weeks. In contrast, a category 2 study has an intervention period of only [REDACTED] in early life (PN[REDACTED]-PN[REDACTED]), followed by a [REDACTED] of high fat diet feeding to investigate metabolic programming, resulting in beneficial health effects in adulthood, even though all animals are fed the same high fat diet from PN[REDACTED] onward.
In 3.4.2, Outline it is textual adjusted into:
"Specifics of the differences between the proposed animal studies are as per category: 1, direct effect: after a run-in reference diet from PN[REDACTED], an intervention period of [REDACTED] with appropriate control dietary groups, intervention dietary groups, and if possible, a positive control dietary group. Indirect calorimetry is performed at the start and end of intervention period. In this way, direct effects of a specific nutrient are investigated.
2, metabolic programming: standardized nests will be stratified at PN[REDACTED], and subsequent groups will be fed the intervention diets for [REDACTED]. A subgroup will be sacrificed at PN[REDACTED], while the remainder of the animals will switch to the high fat diet for another [REDACTED]. Indirect calorimetry will be performed at the end of the interven-

tion and high fat diet periods. A challenge test, like oral glucose tolerance test, hypoxia challenge or a fasting-refeeding challenge in our indirect calorimetry system, is scheduled minimally after [redacted] feeding the high fat diet. In this way, beneficial health effects in adulthood -obtained by metabolic programming during early life- is investigated. This differs from a direct effect (category 1), as health effects were 'programmed' in early life with a [redacted] intervention period, and all groups received the same high fat diet thereafter.

Daarnaast verzoekt ze u een beknopte uitleg te geven over de indirecte calorimetrie (hoe werkt het en wat kun je ermee?).

We added the following explanation under '3.1 Background':

Also the use of indirect calorimetry is a proven accurate method to investigate energy expenditure and oxidative substrate preference. Indirect calorimetry is performed by a closed lid on top of the homecage. This lid contains an air-inlet and air-outlet connected to control units and sensors with a steady airflow through the cage; measuring oxygen consumption and carbon dioxide production allows to determine energy expenditure (kJ/min) and substrate usage (ratio of carbohydrate versus lipid oxidation in case of non-protein respiratory quotient). Moreover, our indirect calorimetry system also has a food and water sensor to measure intake in a real-time mode, and infrared beams in the horizontal plane to measure real-time activity.

M.b.t. de appendices (voor zover van toepassing):

U geeft aan dat humane eindpunten (HEPs) worden toegepast als de haren overeind staan. De DEC acht het denkbaar, dat dit al in een vroeg stadium optreedt terwijl dit geen reden hoeft te zijn om de proef af te breken. De DEC verzoekt u scherper aan te geven, wanneer muizen daadwerkelijk uit de proef zullen worden gehaald. De DEC verzoekt u tevens in dit verband duidelijker aan te geven wat u bedoelt met "Loss of 20% of body weight is considered as an unhealthy situation" en ten opzichte waarvan de 20% wordt gemeten.

This is adjusted as follows (point 2, criteria Humane endpoints):

If animals show less appetite (reduced energy intake), show passive behavior not due to increased obesity, or show erected fur, this will be considered as indications for humane endpoint. Importantly, as a result of our usage of the non-invasive Echo-MRI to measure lean mass and fat mass longitudinally, we will identify compromised health in an early phase, as loss of lean mass is always associated with disease. This is seen in an earlier phase than loss of body weight, so we can monitor in those cases the animals in more detail. Loss of 20% of body weight is considered as an unhealthy situation, although long term caloric restriction leading to an improved health condition, also shows loss of body weight which can reach a similar reduction in body weight (Duivenvoorde et al., J Mol Endo 2011).

Moreover, when mice are placed within our indirect calorimetry system we measure continuously physical activity, which also allows us to monitor animals in a highly detailed manner. As in our studies all mice are growing or in adulthood, not being aged nor frail, the 20% body weight loss is calculated from the time-point where body weight changed from an increased or steady state into body weight loss. This is our primary criteria for humane endpoint.

Bovendien verzoekt zij u, met het oog op het ongerief, dat ermee gepaard gaat beknopt te beschrijven, hoe de Echo-MRI wordt uitgevoerd.

We included the following text (at '3.1 Background', analogous to explanation of indirect calorimetry):

For Echo-MRI measures, an individual mouse is put within an open plastic tube -with normal air available- in which they can move freely. This tube is positioned within the Echo-MRI equipment and a measurement lasts from 30 to roughly 60 seconds. Primary output is given as lean mass (g) and fat mass (g).

Daarnaast verzoekt ze u bij D. expliciet in te gaan op verfijning.

We altered text from "Since sampling of these tissues is not possible in humans (for instance using biopsies)" into "Since sampling of these tissues is not preferred in humans (for instance using biopsies)", as this represents better the (im)possibilities in human studies. Muscle and adipose tissue biopsies are allowed when ethical approval is obtained.

Moreover, we adjusted text into "...As such, we have chosen mostly non-invasive but sensitive measures to answer our research questions (refinement). Mice are always housed in their homecage with bedding and cage enrichment (refinement)..."

M.b.t. appendix 3:

Het in deze appendix beschreven onderzoek naar regulatorisch belangrijke [REDACTED] eiwitten is naar het lijkt vooral belangrijk voor fundamenteel inzicht in het reguleren van de [REDACTED] functie. Het belang hiervan voor een nutritionele beïnvloeding van de metabole gezondheid en bestrijding van obesitasgerelateerde ziekten zoals metabool syndroom wordt aangestipt maar niet duidelijk gemaakt. Met de huidige tekst zou dit deel van het project heel goed als een aparte aanvraag voor fundamenteel onderzoek van [REDACTED] regulatie kunnen worden ingediend. De DEC verzoekt u de samenhang hiervan met de rest van de aanvraag te verduidelijken.

[REDACTED] is crucial for whole body metabolic health, as whole body knockout of the [REDACTED] leads to for instance increased diet-induced obesity and insulin resistance, but only when challenged by an adverse high fat diet [REDACTED] et al., [REDACTED]). This indicates a close relationship between metabolism, [REDACTED] and (metabolic) health. We included more information showing the indissoluble interconnectivity of metabolism and the [REDACTED] at several points in the application, e.g. A. and D. Surprisingly, in [REDACTED]-specific [REDACTED] knockout mice, no effects were seen when such a challenge was applied, which was also true for [REDACTED]-specific [REDACTED] knockout mice ([REDACTED] et al., [REDACTED]). However, those mice were on a (partial) different background [REDACTED] lacking e.g. the functional [REDACTED] gene. These mice are also known to develop e.g. diet-induced obesity and insulin resistance much easier. This might have impact on the results obtained, and we therefore will use mouse strains that do not lack these genes. Additionally, we include [REDACTED] [REDACTED]-specific [REDACTED] knockout mice to investigate whether the whole body SirT3 knockout phenotype can be explained by the absence of [REDACTED] in this metabolically important tissue. Finally, it has been suggested that caloric restriction, which is generally known to improve metabolic health, increases [REDACTED] expression. Altogether, our results will extend and provide new crucial knowledge on the role of [REDACTED] in both [REDACTED] and [REDACTED] tissue on metabolic health during diet-induced obesity and caloric restriction by including morphological and mechanistic information on [REDACTED] dynamics and functioning, which is missing in all previous mentioned research. In more detail, we changed the text in A. as follows to accommodate clearness of integration with the remainder of the application:

"...[REDACTED]. As the metabolic cofactor [REDACTED] has to be bound to the [REDACTED] located [REDACTED] to be functionally active, this shows the highly inter-connectivity of metabolism and regulation of cellular metabolism. [REDACTED] is present in cytoplasm and mitochondria, where it can accept protons (reduction) to become [REDACTED], which subsequently donates the protons (oxidation) to the mitochondrial electron transport chain, representing oxidative phosphorylation, to ultimately produce ATP. As oxidation of carbohydrates and lipids will give rise to a difference in total NADH and FADH, thus also have effects on ratios of mitochondrial NAD/NADH and FAD/FADH, it becomes clear that the regulation by SirT3 is so closely connected to mitochondrial and cellular metabolism, that those cannot be seen as separate entities. Thus, fundamental knowledge on..."

"...Indeed, whole body [REDACTED] knockout mice show increased insulin resistance upon a high fat diet challenge [REDACTED] et al., [REDACTED]). We have tissue-specific [REDACTED] knockout mice to investigate on a molecular level the [REDACTED] function and regulation in a specific tissue and its contribution to whole body effects, and we will analyze this longitudinally..."

In 2.A geeft u eerst aan, dat de muizen ad libitum worden gevoerd en verderop (zowel bij A. als bij F.) dat een deel een caloriebeperkt dieet krijgt. De DEC verzoekt u dit zowel bij A. als bij F. te corrigeren.

To clarify this issue, we have a dual step approach in appendix 3: in the first step, animals are indeed fed ad libitum, but in the second step after [REDACTED] weeks ad libitum feeding a high or low fat diet, the high fat diet-fed mice are divided over three sub-groups, of which only one thereafter receives a high fat diet-restriction during another [REDACTED] weeks. This was stated as follows in A:

"As a second step, a similar approach is used, which is now extended from week [redacted] onward. Focussing on this time-frame, the control low fat dietary group will continue on the low fat diet for another [redacted] weeks, while the subgroup on the high fat diet will be stratified on body weight/fat mass and subdivided into three separate groups: 1) a subgroup continuing on the high fat diet, 2) a subgroup switched to the low fat diet, and 3) a subgroup receiving a HFD-caloric restricted diet (HFD-CR; adjusted for vitamin and mineral content); this group will receive a 20-30energy% restriction during the [redacted] weeks follow-up...."

and in A: "...In step two, the same procedure is followed, but the experimental setup continues for subsets of mice: the low fat dietary group will continue for another [redacted] weeks, while the high fat dietary group will be stratified and subdivided over subgroups: one subgroup continuing on the high fat diet, one group switching to the low fat diet, and one group receiving the high fat diet in a calorie-restricted manner (20-30% restricted, with adjusted vitamin and minerals to have adequate intake levels)...." Section F. was adapted as follows:

Mice will be individually housed as group-housing interferes with the study set-up by not being able to record individual food intake. Offspring mice will be individually housed as soon as they are post-weaning at PN [redacted], because it is essential to monitor individual food intake during the experiment, which is not possible if animals are grouped-housed. The mice will get cage enrichment and bedding throughout the study and in general ad libitum food and water. There are two situations when food availability is restricted:

1) During a short fasting as part of a fasting-refeeding challenge in our indirect calorimetry system. In such a challenge, animals will be fasted at day 4 of the indirect calorimetry measurement to ensure similar basal measurements and start values of energy metabolism of the animals. However, this fasting will be performed during the inactive phase of the animals (light phase) when mice normally do not eat; refeeding starts 1 hour prior to the following dark, active phase. Therefore this adaptation is not expected to intervene with animal well-being.

2) In a step 2 study, where the mice fed a high fat diet for [redacted] weeks, are subsequently divided into subgroups, of which only one subgroup will continue on a high fat diet-restriction regime at 20-30% restriction for another [redacted] weeks. This has previously been shown to result in beneficial health effects, even though body weight and adipose tissue mass decreases (Duivenvoorde et al., J Mol Endo 2011; Hoevenaars et al., Genes Nutrition 2014).

U geeft bij D. aan, dat de KO-muizen geen nadelige effecten ondervinden van de mutaties. De DEC verzoekt u dit met referenties nader te onderbouwen.

We added, as requested, several references as follows in D.:

"For the tissue-specific knockout mice: the whole body [redacted] knockout mice are known to have no adverse effects under basal conditions ([redacted] et al., [redacted]; [redacted] et al., [redacted]), so we therefore do not expect an increase in adverse effects from the tissue-specific knockout. Indeed, previously reported liver-specific and [redacted] specific [redacted] knockout mice were shown to not manifest any overt metabolic phenotype under either chow or high fat diet conditions [redacted] et al., [redacted]. Of note, those tissue-specific knockout mice had a different genetic background than the mice in our studies, and we also focus on [redacted] knockout mice, for which we do not know what the metabolic effects can be."

To provide some more background information:

The references provide the first publication on [redacted] knockout mice [redacted] et al., [redacted], those mice on a high fat diet challenge [redacted] et al., [redacted]) and to investigate tissue specific contributions to metabolic adaptations for [redacted] and [redacted], resp. ([redacted] et al., [redacted]).

Bij D. wordt gesteld dat analyse van [redacted] en [redacted] essentieel is, terwijl bij B. (laatste regel) staat dat er 2 weefsels zullen worden onderzocht. De DEC verzoekt u dit met elkaar in overeenstemming te brengen.

We removed in D. [redacted] as primary focus, as we will focus here on [redacted] and [redacted]

Tot slot verzoekt ze u bij K. toe te voegen hoe de verdeling van ongerief is over de 2 klassen.

We added the following text to K:

"Collectively, the cumulative discomfort of the interventions (in total, n=768) is considered moderate.

OF NOTE: Animals in the basal groups (sacrificed at PN [redacted], in total n=192) will be sacrificed before the start of the intervention. These animals will only experience discomfort from determination of body weight and body composition. The total discomfort of basal groups is therefore minor.

M.b.t. appendix 5:

De DEC verzoekt u het aantal dieren uitgebreider te onderbouwen. Bij de overige appendices zijn de aantallen gebaseerd op diverse publicaties. Voor appendix 5 lijken deze niet van toepassing, aangezien het hier om andere uitleesparameters gaat (radioactiviteit) en de variatie anders is dan bij genexpressie. Het is de DEC niet duidelijk, waarom ook daar 12 muizen per groep nodig zijn.

First of all, we would like to stress that the use of [redacted] as part of the diet or individual nutrient, is [redacted] and safe. In fact, [redacted] is a [redacted] with a nucleus containing 1 neutron more than the natural and more common [redacted]. Being one of the [redacted] it makes up about 1.1% of all [redacted] on earth. Such compounds are safe because they are [redacted]. Our [redacted] in the indirect calorimetry system are however able to measure specifically [redacted] and [redacted], and thus we are able to measure metabolic [redacted] when [redacted] is provided. This has been tested in pilot studies based on both a [redacted], and as part of the [redacted] fraction of the normal diet, using [redacted]) versus [redacted]

We added this in A. as follows:

"In both cases, the food or the nutrient is [redacted] with [redacted], being a safe, [redacted]."

Moreover, in A. statistical methods, we altered the text as follows:

"Pilot studies using a [redacted], as part of the [redacted] bolus given to adult male mice, showed us that using n=12 provides enough power to detect significant differences. Moreover, we also performed a pilot study using a [redacted] test [redacted] versus [redacted] component in the diet), which has much lower levels of [redacted], but again, results showed that with n=12 we will have enough statistical power. Fortunately, if [redacted] is part of a category 1,2, or 4 study, those groups of mice also are based on n=12 and we are thus confident to detect significant differences based on the [redacted] of exhaled air using our indirect calorimetry system."

Naar aanleiding van dit antwoord (08-08-2017): U geeft m.b.t. de onderbouwing van 12 dieren per groep aan, dat uit pilotdata is gebleken dat u met 12 dieren per groep voldoende significantie verkrijgt. De (wettelijk verplichte) vraag is echter om aan te geven of het doel ook met minder dieren kan worden bereikt. De DEC verzoekt u hier nader op in te gaan.

Wat er beschreven was (n=12 geeft voldoende power om statistisch verschil significant aan te tonen) geeft ook de minimale groeps grootte voor een dergelijke meting weer; tegelijkertijd realiseren we ons dat tijdens dergelijke metingen ook energy expenditure en substrate usage (RER), plus activity gemeten worden die ons ook informatie geven. Het gebruik van RER-metingen tijdens een metabole flexibiliteitstest in de indirecte calorimetrie geeft aan dat m.b.t. statistische power, minimaal n=12 noodzakelijk is (appendix 1). Cumulatief is er dus minimaal n=12 noodzakelijk, maar ook tegelijkertijd voldoende om significante verschillen waar te kunnen nemen.

De onderstreepte tekst is toegevoegd om dit duidelijker te maken.

"Pilot studies using a [redacted], as part of the [redacted] bolus given to young adult and middle aged male wildtype [redacted] mice, representing two age groups with a difference in metabolic flexibility as published [redacted] et al., [redacted], showed us that using minimally n=12 provides enough power to detect significant differences. Moreover, we also performed a pilot study using [redacted] test [redacted] versus [redacted] component in the diet), which has much lower levels of [redacted], but again, results indicated that with minimal n=12 we will have enough statistical power to detect significant differences. Fortunately, if [redacted] is part of a category 1,2, or 4 study, those groups of mice also are based on n=12 and we are thus confident to detect sig-

nificant differences based on the [REDACTED] of exhaled air, using our indirect calorimetry system”.

Bovendien verzoekt de DEC u bij I. (adverse effects on welfare) toe te voegen dat de muizen individueel worden gehuisvest en de maatregelen ter beperking van ongerief die hieraan gekoppeld zijn te vermelden.

We added the following text in I.:

“Mice will be individually housed, with bedding and cage enrichment. No additional adverse effects on welfare are expected by [REDACTED] challenge or [REDACTED].”

Tot slot had de DEC enkele redactionele opmerkingen, die door de onderzoeker zijn verwerkt.

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 aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de behandeling van de aanvraag en het opstellen van het advies: n.v.t.

C. Beoordeling (inhoud)

1. De DEC heeft vastgesteld dat de aanvraag toetsbaar is. De samenhang lijkt door het afwezig zijn van concrete studiedoelen (welke stoffen gaan ze waarom testen) moeilijk te beoordelen, wel is de samenhang van het doen van de diverse proeven om stoffen te testen in voeding met het oog op een beter begrip van metabool syndroom duidelijk, in die zin toetsbaar. De DEC vraagt zich af of het mogelijk is een aantal bijlagen te combineren. Daar is over gesproken in de IvD, maar er zitten toch verschillende invalshoeken in, o.a. i.v.m. het gebruik van KO-muizen, de IvD achtte de keuze van de onderzoeker in die zin navolgbaar, ook met het oog op de follow-up van de experimenten en heeft dit aan de verantwoordelijkheid van de onderzoeker overgelaten. Met het oog op mogelijke vermindering is aan de onderzoeker evenwel gevraagd, waarom appendix 1 en 2 niet kunnen worden samengevoegd (zie A.9).
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, hoewel het in haar ogen meer fundamenteel dan toegepast onderzoek lijkt, aangezien de toepassing nog ver weg lijkt. De start is wetenschappelijk, maar uiteindelijk is er interesse van partijen om het toe te passen.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van de aanvraag is het testen van verschillende stoffen uit onze voeding in vijf verschillende voedingsproeven in muizen die gevoelig zijn voor overgewicht. Het uiteindelijke doel van de aanvraag is een causaal verband te vinden tussen inname van voedingsstoffen op jonge leeftijd en metabool syndroom. De DEC heeft vastgesteld dat er een directe en reële relatie is tussen beide doelstellingen is en dat het directe doel gerechtvaardigd is binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belanghebbenden en hun morele waarden in het project zijn:
 - mensen met metabool syndroom: gezondheid
 - proefdieren (muizen): ongerief door proefbehandelingen, hun gezondheid wordt niet bevorderd
 - onderzoekers: wetenschappelijke kennis, carrièrekansen
 - de maatschappij (op termijn): (kosten) volksgezondheid
 - levensmiddelenindustrie: economisch belang, vermarkting van gezonde producten

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. Er lijken redelijk wat publicaties aan ten grondslag te liggen.
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 doelstellingen binnen het kader van het project. Het uitvoeren van de testen sluit goed aan bij de opzet. De keuze van de te testen voedingsmiddelen in relatie tot de daarvan te verwachten effecten op de langetermijnontwikkeling van metabool syndroom is nu niet duidelijk. Dat is in de ogen van de DEC echter niet nodig om een afwijking te kunnen maken.

Welzijn dieren

9. Er is sprake van de volgende bijzonderheid op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: in een type dierproef (appendix 5) wordt geen pijnbestrijding toegepast. Dit is voldoende beargumenteerd.
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 individueel gehuisvest, dat is voldoende onderbouwd.
11. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "licht" of "matig" voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. De onderzoeker geeft aan dat er geen sprake is van ongerief van de KO-muizen door de [REDACTED] storing. Het ongerief bestaat (afhankelijk van het type dierproef) uit: individuele huisvesting, hanteren van de dieren (t.b.v. wegen, Echo-MRI, indirecte calorimetrie), vasten, orale gavage met geringe bloedafname tijdens de orale glucosetolerantietest.
12. Naast ongerief is er geen sprake van aantasting van integriteit van het dier anders dan door de proefbehandelingen.
13. De DEC heeft vastgesteld dat de criteria voor humane eindpunten goed zijn gedefinieerd en dat goed is ingeschat welk percentage van de dieren een humaan eindpunt zal bereiken.

3 V's

14. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Voor het vaststellen van het mechanisme achter effecten van voeding(stoffen) op complexe processen (zoals interactie tussen organen, energiemetabolisme/stofwisseling, aanpassingsvermogen) zijn (nog) geen proefdiervrije (in-vitro)methoden beschikbaar.
15. De DEC heeft vastgesteld dat de onderzoeker voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Een gefaseerde uitvoering van statistisch onderbouwde experimenten vormt de basis voor optimale uitvoering van dit wetenschappelijke onderzoek, mede ondersteund door ervaring in het voedingsdomein met dergelijke dierstudies. Zo min mogelijk muizen met zo min mogelijk ongerief zullen gebruikt worden, waarbij voldoende data verkregen worden om betrouwbare conclusies te trekken. Mannen en vrouwen kunnen verschillend op voeding reageren. Daarom worden mannetjes- en vrouwtjesmuizen in het onderzoek vergeleken. Inteelmuizen worden gebruikt omdat dit variatie reduceert en er dus minder proefdieren gebruikt hoeven te worden.
Afhankelijk van er precies wordt g test en van wat daarover bekend is qua seksegevoeligheid kan worden bepaald of het nodig is om beide seksen te onderzoeken en zo ja, of er in totaal met minder dieren kan worden volstaan. Dit moet per experiment worden onderbouwd en is naar de mening van de DEC ter beoordeling aan de IvD.
16. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De proeven worden zo humaan mogelijk uitgevoerd. Er is gekozen voor methoden die veel inzicht, maar zo min mogelijk ongerief geven voor de dieren geven, zoals de niet-invasieve ademhalingsluchtanalyses en het meten van het vet-

percentage m.b.v. de Echo-MRI, waarbij geen anesthesie nodig is. De muizen worden dagelijks gecontroleerd op welzijn. Muizen worden altijd in hun thuishok gehuisvest met bedding en kooiverrijking.

De DEC ziet geen extra mogelijkheden voor verfijning, anders dan die de onderzoeker nu toepast.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

17. De dieren worden in principe van beide geslachten in gelijke mate ingezet in de proeven. In geval er in de literatuur aanwijzingen zijn om hiervan af te wijken zal dit met de IvD worden overlegd.
18. De dieren worden gedood in het kader van het project. Er worden weefsels en organen geïsoleerd. De dieren worden gedood volgens een passende methode die vermeld staat in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag van het project is: Rechtvaardigt het doen van onderzoek naar metabool syndroom en de onderliggende oorzaken, de inzet van 5500 dieren, die licht of matig ongerief ondergaan?

2. In de afweging heeft de DEC geconstateerd dat het hier gaat om een aanvraag met voldoende samenhang.

Zij heeft meegewogen dat er gezien het directe doel voor de onderzoekers/ het onderzoeksinstituut sprake is van een beperkt voordeel. Het gaat hierbij om carrièremogelijkheden en kennisvermeerdering.

Daarnaast zijn de waarden van de proefdieren in het geding. Een deel van de dieren zal maximaal matig nadeel ondervinden als gevolg van de handelingen binnen dit project.

Als het project zijn doel bereikt, zal in potentie er sprake zijn van een substantiële gezondheidswinst voor een aanzienlijk deel van de bevolking dat lijdt aan metabool syndroom. Wereldwijd gaat het om grote aantallen. Naast gezondheidswinst kan er voor de maatschappij op termijn ook een reëel voordeel worden behaald door verlaging van de kosten voor de volksgezondheid. Tot slot kan de levensmiddelenindustrie (economisch) voordeel hebben door vermarkting van de kennis uit dit project. De DEC heeft dit ingeschat als een beperkt belang in de ethische afweging.

Op basis van bovenstaande overwegingen is de DEC van mening dat het ethisch verantwoord is om onderzoek te doen naar 5.500 dieren met maximaal matig ongerief voor maximaal 5.280 dieren. De DEC ziet in dit stadium geen mogelijkheden op het terrein van vervanging, vermindering van het aantal dieren en verfijning van de aanvraag.

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. Onderstaand dilemma is naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies: het project richt zich op een probleem (obesitas) dat als welvaartsziekte kan worden beschouwd, waarvan mensen zelf deels probleemeigenaar zijn en waar ze door gedragsverandering invloed op hebben. Dit blijkt in de praktijk niet gemakkelijk realiseerbaar. Het probleem is omvangrijker dan dat alleen. Bovendien heeft de WHO obesitas als een ziekte geïdentificeerd. Daarnaast richt het project zich op imprinting bij jonge kinderen die geen invloed hebben op hun voeding en het beperken van nadelige effecten van de welvaart op hun ontwikkeling. Binnen de context dat de DEC verwacht dat de welvaart niet zal afnemen en de neiging tot (over)consumptie ook niet, laat zij het belang van kennisontwikkeling en de zoektocht naar oplossingen hiervoor zwaarder wegen dan het matige ongerief bij 5.500 proefdieren.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University & Research



Postbus 59
6700 AW 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
AVD1040020171668
Bijlagen
2

Datum 12 mei 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 11 mei 2017. Het gaat om uw project "Nutritional Physiology and Metabolic Health in human, mouse as a model". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1040020171668. 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:

12 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1040020171668

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
12 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1040020171668

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10400
Naam instelling of organisatie: Wageningen University & Research
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: [REDACTED]
Straat en huisnummer: Akkermaalsbos 12
Postbus: 59
Postcode en plaats: 6700 AW WAGENINGEN
IBAN: NL10RABO0397066465
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Wageningen UR

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
12 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1040020171668

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: 

Functie: Onderzoeker

Afdeling: 

E-mailadres: 

Over uw aanvraag

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

Over uw project

Geplande startdatum: 1 augustus 2017
Geplande einddatum: 1 augustus 2022
Titel project: Nutritional Physiology and Metabolic Health in human, mouse as a model
Titel niet-technische samenvatting: voedingsfysiologie en Metabole Gezondheid in muis als model voor de mens
Naam DEC: Dec Wageningen UR
Postadres DEC: Droevendaalsesteeg 4 6708 PB Wageningen
E-mailadres DEC: dec@wur.nl

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.827,-
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Ondertekening

Naam: 

Functie: 

Plaats: Wageningen

Datum: 11 mei 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

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


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1040020171668
Bijlagen
2

Datum 12 mei 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 12 mei 2017
Vervaldatum: 11 juni 2017
Factuurnummer: 171668
Ordernummer: WUR1059476

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1040020171668	€ 1.827,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University & Research

Postbus 59

6700 AW 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
AVD1040020171668

Datum 11 juli 2017

Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 11 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nutritional Physiology and Metabolic Health in human, mouse as a model" met aanvraagnummer AVD1040020171668. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

- Het totaal aantal dieren in de verschillende bijlagen is 4892, niet de door u in de NTS aangegeven 5500. Graag dit aanpassen in de NTS (en indien nodig de percentages licht/matig ongerief aanpassen).
- De eerste twee zinnen lijken tegenstrijdige informatie te geven. Graag dit aanpassen.
- Paragrafen 3.1 en 3.4 zijn erg moeilijk beschreven. Graag deze aanpassen zodat deze duidelijk zijn voor de leek.

Onduidelijkheden

- De samenhang van uw aanvraag is niet volledig duidelijk. Kunt u een schematisch overzicht geven van de relatie tussen de verschillende onderdelen en de beslismomenten hiertussen?
- Het is ons nog niet duidelijk welke stoffen u zult gaan testen. Kunt u aangeven wat de criteria zijn waarop u uw te testen stoffen selecteert alvorens deze in vivo te testen?

- In bijlage 3.4.4.1 is onduidelijk hoe u aan de aangevraagde dieraantallen komt. Graag dit verhelderen.
- Bij bijlage 3.4.4.5 is vraag J niet ingevuld, gelieve dit nog aan te vullen.

Datum:
11 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1040020171668

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.

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlagen:

- Melding bijlagen
- Niet technische samenvatting

Datum:

11 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD1040020171668

Below, we provide the questions and issued raised by the CCD, which we received on July 11th 2017, and we provide our responses. Overall, textual alterations in the proposal have been implemented and saved in IVention.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

- Het totaal aantal dieren in de verschillende bijlagen is 4892, niet de door u in de NTS aangegeven 5500. Graag dit aanpassen in de NTS (en indien nodig de percentages licht/matig ongerief aanpassen).

Response: We changed in the NTS the total number of mice as indicated to 4892, and apologize for this omission. The percentage of animals with welfare level 'licht' was and is based on the total of 4892 animals, so correctly shown in the NTS.

- De eerste twee zinnen lijken tegenstrijdige informatie te geven. Graag dit aanpassen.

Response: We altered text to exclude potential conflicting information as follows: "Steeds meer mensen kampen met (ernstig) overgewicht; in Nederland heeft al meer dan 50% van de populatie overgewicht en Wereldwijd al bijna 40%. Wereldwijd heeft 13% van de bevolking zelfs al ernstig overgewicht, oftewel obesitas. Overgewicht/obesitas is een erkende ziekte en is bovendien..."

- Paragrafen 3.1 en 3.4 zijn erg moeilijk beschreven. Graag deze aanpassen zodat deze duidelijk zijn voor de leek.

Response: We altered paragraphs 3.1 and 3.4 extensively in order to increase its accessibility for a non-scientific reader.

Onduidelijkheden

- De samenhang van uw aanvraag is niet volledig duidelijk. Kunt u een schematisch overzicht geven van de relatie tussen de verschillende onderdelen en de beslismomenten hiertussen?

Response: A schematic overview of the appendices that are part of this application are provided as attachment to the email, all centred around measuring metabolic health improvements using nutrients or food bioactives. This overview has previously also been send to the IvD, and we regret that it is not a standard possibility to include such an overview to the proposal. Which specific appendix is selected for an animal study is first of all based on the compound. For example, [REDACTED] as food bioactive is well described for its hepatic lipid oxidation enhanced effects, but [REDACTED] of [REDACTED] is suggested, but not yet proven, which might present a nutritional opportunity to improve glucose homeostasis. Therefore, we will use appendix 1 to study [REDACTED] direct effects on glucose homeostasis.

Likewise, preliminary data suggest metabolic programming by [REDACTED] and [REDACTED] in [REDACTED]. This will be further studied using an animal study setup described in appendix 2.

For the [REDACTED] tissue-specific knockouts, we will use appendix 3; [REDACTED] is a [REDACTED] of energy metabolism and thereby plays a crucial role in oxidative metabolism.

For studies focussing on [REDACTED], we will apply appendix 4. Again, based on the specific compound to be studied, both published and preliminary unpublished studies will provide background information for best study setup to fit scientific research question(s).

Finally, to determine [REDACTED] and (beneficial health) alterations induced by food bioactives or specific nutrients, we will apply appendix 5. To measure [REDACTED], we [REDACTED] our non-invasive indirect calorimetry system with [REDACTED] to measure specifically [REDACTED] which showed –preliminary- reproducible results using [REDACTED] and even [REDACTED].

- Het is ons nog niet duidelijk welke stoffen u zult gaan testen. Kunt u aangeven wat de criteria zijn waarop u uw te testen stoffen selecteert alvorens deze in vivo te testen?

Response:

Selection of nutrient or compound is, and will be, based on prior knowledge from either published or our own *in vitro* studies or non-overlapping *in vivo* studies. As an example, the [REDACTED] shows in silico an [REDACTED] of the enzyme [REDACTED] et al., [REDACTED]) which might resemble the anti-diabetic pharmacological compound [REDACTED]. *In vivo*, a direct effect has been described for [REDACTED] in rats [REDACTED] et al., [REDACTED]), but effects on [REDACTED] as nutritional treatment of metabolic health remain elusive. In all cases, doses will be in the physiological range, not in the toxicological range, and will be discussed with the IvD.

Based on the research questions of the overarching (larger PhD) project(s), a choice selection will be made for the study category, that is

for instance either analysing a direct effect (e.g. ██████████), or a metabolic programming effect (e.g. ██████████ or ██████████). In all situations, nutrient dose(s) will be at relevant physiological nutritional level. If a category 4 study (e.g. doses of ██████████) is planned, precautions will be made in order to have ██████████ levels in diets and the level of different doses will be discussed beforehand with the IvD. Overall, selected nutrients have added interest based on for instance recent, as of yet unpublished, data; these include specific ██████████ (e.g. ██████████ versus ██████████), specific ██████████ versus ██████████), the ██████████, and ██████████. This latter class of nutrients is foreseen to be analysed using a category 4 study, in which the interaction with a higher dietary ██████████ level or an altered dietary ██████████ will be used as different intervention groups. Usage of ██████████ can be foreseen in future clinical studies focusing on ██████████s in order to support beneficial programmed metabolic health into adulthood (applied research), which might even underlie the beneficial health effects propagated by the 1,000-days window of good nutrition in the first 1,000 days of a child's life. This is largely described in paragraph 3.4.1.

- In bijlage 3.4.4.1 en 3.4.4.2 is onduidelijk hoe u aan de aangevraagde dieraantallen komt. Graag dit verhelderen.

Response: Unfortunately, we are unable to trace which paragraphs are exactly meant, as 3.4.4.1 and 3.4.4.2 do not seem to be present in IVention, nor in the resulting proposal. Nevertheless, we carefully checked every appendix for its description for usage of a specific number of animals under "Choice and justification animals". This is for appendices 1-4 described, including the power calculations for metabolic flexibility analysis, or global transcriptomics analysis, which underlie our choices. However, for appendix 5 it might have been under-described and we extended the description here. By doing so, we hope the support for our reasoning to come to the indicated selection of number of animals is valued.

- Bij bijlage 3.4.4.5 is vraag J niet ingevuld, gelieve dit nog aan te vullen.

Response: For appendix 5, we qualified Humane endpoints as 'No', since the study length in appendix 5 is very short (e.g. single gavage and follow-up thereafter), especially when compared to the other appendices. Based on the request of the CCD, we altered this into a 'Yes' and described the criteria and incidence at points J.2 and J.3.

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.

Response: We will make sure that payment is done in time, if it has not been done already.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen University & Research

Postbus 59

6700 AW 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
AVD1040020171668
Bijlagen

1

Datum 25 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 11 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nutritional Physiology and Metabolic Health in human, mouse as a model" met aanvraagnummer AVD1040020171668. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 14 juli en 19 juli 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek is de NTS verduidelijkt en de dieraantallen in de NTS consistent gemaakt met die in de aanvraag, is de samenhang verhelderd en zijn in bijlage 3.4.4.5 de dieraantallen 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.

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.

Omdat uit uw aanvraag niet blijkt welke stoffen u zal gaan onderzoeken, maar de uit te voeren handelingen wel omschreven zijn, is een voorwaarde opgenomen dat u de CCD moet terugkoppelen naar welke soort stoffen onderzoek plaats heeft gevonden. Deze voorwaarde is gesteld omdat de CCD graag een beeld wil krijgen van wat voor soort stoffen/experimenten worden uitgevoerd onder deze vergunning. Op deze wijze houdt de CCD zicht op het soort experimenten dat gedaan wordt en het soort stoffen dat getest wordt.

U kunt met uw project "Nutritional Physiology and Metabolic Health in human, mouse as a model" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 augustus

2017 tot en met 31 juli 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een maximale looptijd van 5 jaar kan hebben.

Datum:
25 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1040020171668

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. Dit advies is opgesteld op 21 juni 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Bezwaar

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

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

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven

namens deze:



M. G. de Feuter

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
25 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1040020171668



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Wageningen University & Research

Adres: Postbus 59

Postcode en plaats: 6700 AW WAGENINGEN

Deelnemersnummer: 10400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022, voor het project "Nutritional Physiology and Metabolic Health in human, mouse as a model" met aanvraagnummer AVD1040020171668, volgens advies van Dierexperimentencommissie Dec Wageningen UR. 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 11 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 juli 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 juli 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 21 juni 2017, ontvangen op 21 juni 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 14 juli en 19 juli 2017.

Aanvraagnummer:
AVD1040020171668

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Direct nutritional effects on metabolic health and flexibility				
	Muizen (Mus musculus) /	648	Matig	
3.4.4.2 Metabolic programming effects of metabolic health and flexibility				
	Muizen (Mus musculus) /	864	Matig	
3.4.4.3 Longitudinal effects by nutrients in tissue-specific [redacted] knockout mice				
	Muizen (Mus musculus) /	1.920	90% Matig 10% Licht	
3.4.4.4 Dose effects – interactions on metabolic health and flexibility: focus on [redacted]				
	Muizen (Mus musculus) /	960	Matig	
3.4.4.5 [redacted] to investigate non-invasive [redacted]				
	Muizen (Mus musculus) /	480	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.

Gedurende de looptijd van de vergunning, koppelt de aanvrager aan de CCD terug welk type/soort teststof is getest onder deze vergunning. Deze terugkoppeling moet uiterlijk 31 maart door de CCD ontvangen zijn

Aanvraagnummer:
AVD1040020171668

en rapporteert over het afgelopen kalenderjaar (1 januari - 31 december). Ook wanneer er geen dierstudies zijn uitgevoerd wordt dit gerapporteerd. De CCD kan op basis van deze terugkoppeling aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken. Wanneer u overtuigend en onbetwistbaar kunt aantonen dat er geen gegevens over de geteste stof kunnen worden vrijgegeven omdat de opdrachtgever deze als vertrouwelijke informatie heeft geclassificeerd kunt u deze informatie buiten de rapportage houden.

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



Aanvraagnummer:

AVD1040020171668

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:
AVD1040020171668

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 W17-12									
nr.	documenten NTS20171924	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
10	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
11	Advies CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x	x	



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

<p>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></p>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen
<p>1.2 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.</p>	<p>Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</p> <p>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde: Instantie voor dierenwelzijn</p> <p>KvK-nummer: 4 1 0 5 5 6 2 9</p>
<p>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></p>	<p>Straat en huisnummer: Geert Grooteplein 10</p> <p>Postbus: 9101, [redacted]</p> <p>Postcode en plaats: 6500HB Nijmegen</p> <p>IBAN: NL90ABNA0231209983</p> <p>Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud</p>
<p>1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.</p>	<p>(Titel) Naam en voorletters: [redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</p> <p>Functie: wetenschappelijk onderzoeker</p> <p>Afdeling: [redacted]</p> <p>Telefoonnummer: [redacted]</p> <p>E-mailadres: [redacted]</p>
<p>1.5 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.</p>	<p>(Titel) Naam en voorletters: <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</p> <p>Functie:</p> <p>Afdeling:</p> <p>Telefoonnummer:</p> <p>E-mailadres:</p>

- 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. [REDACTED]
- Functie Instantievoor Dierenwelzijn
- Afdeling [REDACTED]
- Telefoonnummer [REDACTED]
- E-mailadres [REDACTED]
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging mee met deze aanvraag*
- Nee

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 0 1 . 0 7 . 2 0 1 7
- Einddatum 3 0 . 0 6 . 2 0 2 2
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC RU DEC
- Postadres Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
- E-mailadres [REDACTED]

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.541,00 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
 DEC-advies en factuurinformatie

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	██████████
Functie	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats	Nijmegen
Datum	3 0 - 0 5 - 2 0 1 7
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'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren |

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.
-

Gewrichtskraakbeen is een weefsel dat bestaat uit een relatief gering aantal cellen die zijn omgeven door zelfgemaakte moleculen die in staat zijn de grote krachten te verwerken die dit weefsel moet opvangen. Er lopen geen bloedvaten of zenuwen door dit weefsel en beschadigingen kunnen niet worden gerepareerd door de chondrocyt (kraakbeencel) . Ook aanbrengen van chondrocyten of stukjes kraakbeen in de beschadiging leidt niet tot een duurzaam herstel (Falah, 2010). Bij de ziekte osteoartrose is kraakbeenschade een groot probleem. Dit leidt tot functieverlies en veel pijn bij de patiënten. Kraakbeen kan tot niet worden gerepareerd en er is geen therapie die de ziekte stopt of vertraagt, zodat uiteindelijk een totale gewrichtserving de enige oplossing is.

De laatste jaren is de hoop gevestigd op kraakbeen reparatie door stamcellen. Deze cellen kunnen in het laboratorium in aanwezigheid van de juiste groeifactoren aangezet worden tot vorming van kraakbeen. In de kliniek heeft het aanbieden van stamcellen of het boren van gaatjes in het aangedane gebied om stamcellen vanuit het beenmerg toegang te verschaffen tot nu toe geen duurzaam kraakbeenherstel opgeleverd (Scotti, 2016). Onze groep heeft aangetoond dat stoffen in het zieke gewricht de chondrogene differentiatie, de uitrijping van stamcellen tot chondrocyten, remmen (Heldens, 2012). Tissue engineering op basis van stamcellen zou waarschijnlijk veel beter verlopen als we de blokkerende stoffen die het zieke gewricht maakt kunnen remmen. We hebben al gevonden dat de meest voor de hand liggende stoffen interleukine-1 (IL-1) en tumour necrosis factor-alpha (TNF-a) niet de boosdoeners zijn (Heldens, 2012) . Om dit te onderzoeken hebben we gebruik gemaakt van een eenvoudig in vitro model. Hiervoor werden humane mesenchymale stamcellen als pellets (compacte bolletjes) gekweekt in medium met de juiste groeifactoren voor uitrijping tot kraakbeen, waarbij met name transforming growth factor beta (TGF-b) van belang is voor de juiste differentiatie. Vroeg in dit proces werd medium toegevoegd waarin synovium (binnenste laag van het gewrichtskapsel) uit osteoartrotische gewrichten gedurende 24 uur was gekweekt. Door de stoffen die het synovium daarin had uitgescheiden, werd de kraakbeenvorming geremd en dit hebben we gebruikt als een in vitro model voor belemmering van kraakbeenherstel in een ziek gewricht. We weten niet welke stoffen uit het gewricht verantwoordelijk zijn voor belemmering van kraakbeenherstel. IL1 en TNFa zijn het niet en dan zou je nog honderden minder voor de hand liggende eiwitten moeten gaan

testen op hun betrokkenheid. Daarom hebben we gebruik gemaakt van proteïne kinase remmers, die signaleringsroutes in de cel blokkeren. Op deze wijze heeft onze groep al een paar van deze intracellulaire signaleringsroutes gevonden die betrokken zijn bij belemmering van kraakbeenvorming (van Beuningen, 2014). De bescherming van de chondrogene differentiatie door de remmers werd beoordeeld op basis van histologie en mate van depositie van proteoglycanen (kraakbeen-specifieke extracellulaire matrix molekulen) in de celpellets. Remming van Janus kinases (JAKs) door tofacitinib (pan-JAK remmer) en van TGF- β -activated kinase (TAK) door oxozaenol bleek kraakbeenvorming te beschermen, en combinatie van deze remmers bleek nog effectiever. Om het belang van deze signaleringsroutes, en het effect van het remmen van deze routes op kraakbeenherstel, duidelijk te krijgen, hebben we een in vivo model nodig dat een goede reflectie geeft van de humane situatie. Ons lab is gespecialiseerd in het kniegewricht van de muis. Dat is zo klein dat eigenlijk alleen de patellaire groef benaderbaar is voor het maken van een kraakbeen defect. Deze techniek is de enige die is beschreven voor studies aan herstel van gewrichtskraakbeen in de muis (Fitzgerald, 2008 en Eltawil, 2009). We zijn in staat in de knie van de muis op een specifieke plaats reproduceerbaar een full-thickness defect te maken. Deze techniek houdt in dat we een gaatje maken in het gewrichtskraakbeen tot juist in het onderliggende bot. Doordat het defect tot in het onderliggende bot doorloopt, kunnen stamcellen vanuit het beenmerg het defect bereiken en hier nieuw kraakbeen produceren (in analogie met orthopedische procedures in humane gewrichten). Na de operatie kan het kraakbeenherstel worden bestudeerd. Ons lab heeft veel ervaring met histologische analyse van het kniegewricht van de muis.

Referenties:

Falah, M et al. Treatment of articular cartilage lesion of the knee. *Int Orthop* 34:621, 2010.

Scotti, C et al. Cartilage repair in the inflamed joint: considerations for biological augmentation toward tissue regeneration. *Tissue Engineering Part B Rev*, 22:149-159, 2016.

Heldens, GTH et al. Catabolic factors in osteoarthritis-conditioned medium inhibit chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering Part A*, 18:45-54, 2012.

van Beuningen, HM et al. Inhibition of TAK1 and/or JAK can rescue impaired chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in osteoarthritis-like conditions. *Tissue Engineering Part A*, 20:2243-2252, 2014.

Fitzgerald, J et al. Evidence for articular cartilage regeneration in MRL/MpJ mice. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16:1319-1326, 2008.

Eltawil, NM et al. A novel in vivo murine model of cartilage regeneration. Age and strain-dependent outcome after joint surface injury. *Osteoarthritis and Cartilage*, 17:695-704, 2009.

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?

De hoofddoelstelling is het bevorderen van kraakbeenherstel door het remmen van nadelige intracellulaire signaalroutes in stamcellen in een geactiveerd gewricht. Die activering kan ontstaan door kraakbeenschade alleen, maar in patiënten is vaak sprake van kraakbeenschade in combinatie met osteoartrose, of kraakbeenschade in combinatie met ontsteking. De te gebruiken remmers, genoemd in paragraaf 3.1, zijn naar voren gekomen in het in vitro vooronderzoek waarin ze kraakbeenherstel verbeterden in aanwezigheid van stoffen uit het osteoartrotische gewricht.

Haalbaarheid

De operatie die nodig is om het gewrichtskraakbeen te kunnen bereiken en daarna de wond weer te sluiten is gelijk aan de operatie voor het destabilisatie mediale meniscus (DMM) model (beschreven onder animal procedure 2) die door onze afdeling regelmatig wordt uitgevoerd. De vaardigheid in het reproduceerbaar aanbrengen van full-thickness defecten op een specifieke plaats in het gewrichtskraakbeen is elders geleerd en op het eigen CDL geoptimaliseerd. Histologie van 4 of 8 weken na de operatie diende als controle op de technische uitvoering en liet tevens zien dat de operatie activatie van het gewricht veroorzaakt (geringe osteophyt vorming). Op de afdeling experimentele reumatologie is veel expertise op het gebied van muismodellen voor artritis en artrose. Ook is veel ervaring met het maken en analyseren van histologische preparaten van de gewrichten van de muis. Alle bijbehorende vaardigheden worden routinematig uitgevoerd, wat de haalbaarheid van dit project ten goede komt. Het aantal remmers dat we willen testen is vooralsnog beperkt. Nieuwe kandidaten zullen niet in hoog tempo opdoemen. Ook gezien de lange duur van de experimenten zal het aantal te testen remmers of remmer-combinaties niet meer dan 5 per jaar zijn.

3.3 Relevance

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

De wetenschappelijke vraag die ten grondslag ligt aan de voorafgaande in vitro experimenten is: welke intracellulaire signaal routes worden gebruikt door voor kraakbeenvorming nadelige stoffen uit het osteoartrotische (OA) gewricht? Verder onderzoek van die routes zou kunnen leiden tot identificatie van de verantwoordelijke stoffen. De dierexperimenten moeten aangeven of de geselecteerde signaal routes ook verantwoordelijk zijn voor slecht kraakbeenherstel in vivo.

Gewrichtskraakbeen is niet in staat zichzelf te repareren en chirurgische methoden om kraakbeen te repareren hebben tot nu gefaald. Ongevallen en sportblessures zijn de belangrijkste oorzaken van acute kraakbeenschade. Ook de ziekte osteoartrose (OA) leidt tot ernstige schade aan het gewrichtskraakbeen. Deze ziekte treft een groot deel van de bevolking. In het jaar 2011 leden in ons land 594.000 mensen aan OA van de knie en 359.000 mensen aan OA van de heup (bron: RIVM). De hoop is gevestigd op genezing van kraakbeenschade door stamcellen. Bij voorkeur zouden die stamcellen uit naburige weefsels worden gerekruteerd. De grote uitdaging is om kraakbeenherstel door stamcellen te realiseren in door schade of ziekte geactiveerde gewrichten. Niet alleen voor mensen, maar ook voor dieren is dit van groot belang (veterinair belang, paard, hond).

3.4 Research Strategy

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

Met behulp van ons in vitro systeem met stamcellen die worden aangezet tot kraakbeenvorming hebben we twee remmers van intracellulaire signaalroutes gevonden die kraakbeenvorming mogelijk maken ondanks de aanwezigheid van factoren uit het osteoartrische(OA) gewricht. Deze veelbelovende stoffen willen we nu ook in het kniegewricht van de muis testen op het bevorderen van kraakbeenherstel door stamcellen. Dit zal gedaan worden door stamcellen die vanuit het eigen beenmerg toestromen naar een aangebrachte kraakbeenschade. Omdat de remmers zijn gevonden in een OA omgeving gaan we in eerste instantie ook kijken naar herstel van aangebrachte schade binnen een model voor OA. In OA patiënten met kapot kraakbeen zal tissue engineering met behulp van stamcellen ook in een dergelijke omgeving moeten worden uitgevoerd. Als de te testen remmers ook in vivo kraakbeenherstel tegen een OA achtergrond blijken te bevorderen, zullen we kijken of ze ook werken in twee andere klinisch relevante situaties, nl een gewricht met alleen kraakbeenschade (trauma) en een gewricht met schade en ontsteking (artritis). In eerste instantie willen we de TAK1 remmer oxozeaenol en de JAK remmer tofacitinib testen, afzonderlijk en in combinatie. De combinatie van beide remmers is tijdens de in vitro voorstudies (van Beuningen, 2014) namelijk nog effectiever gebleken dan de afzonderlijke remmers (additieve effecten). Omdat tofacitinib alle vier de JAKs remt (JAK1, JAK2, JAK3 en TYK2) zullen we ook specifieke JAK remmers testen, in de hoop dat de afzonderlijke JAKs een specifieke rol spelen in het doorgeven van gunstige of nadelige signalen. Als een van de specifieke JAK remmers gelijk aan of beter dan tofacitinib werkt zal deze ook in combinatie van de remmer van de TAK1 signaleringsroute getest worden om te zien of die combinatie extra effectief is. Om de genoemde kandidaten afzonderlijk en in besproken combinaties te testen zijn rond de tien experimenten nodig, alleen al binnen het OA model. Mogelijk komen in de nabije toekomst uit nieuwe kennis en eigen in vitro tests nog andere belangrijke signaleringsroutes naar voren die betrokken zijn bij de schadelijke inwerking van het OA gewricht op kraakbeen herstel. Experimenten zullen in eerste instantie worden uitgevoerd met een muizenstam die, net als de mens, geen spontaan herstel van kraakbeenschade laat zien. Een risico is dat onze in vitro voorscreening is gebaseerd op uitrijping van de stamcel, terwijl de niet herstellende muizenstam mogelijk op een eerder niveau faalt, zoals bij de recrutering van de stamcellen; we zagen immers in eerdere experimenten met C57Bl/6 muizen geen cellen binnenkomen in het kraakbeendefect. Daarom zullen we bij tegenvallende resultaten ook kijken of de proteïn kinase remmers herstel kunnen versnellen in een muizenstam die het kraakbeen wél spontaan herstelt, zoals de DBA1 of de MRL/MpJ (gebruikt in de eerder genoemde studies van Fitzgerald 2008 en van Eltawil 2009).

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.

Een kraakbeendefect (gaatje in het gewrichtskraakbeen tot in het subchondrale bot) zal worden aangebracht. Drie dagen na deze operatie zullen de muizen de beschermende stof toegediend krijgen via osmotische pompjes (eventueel kan dit ook via dagelijkse orale gavage, of via het drinkwater). Na 8 weken zullen de gewrichten uitgeprepareerd worden voor histologische analyse van het kraakbeenherstel. De geselecteerde remmers die in vitro chondrogene differentiatie verbeteren in OA condities, zullen in vivo eerst getest worden in muizen met kraakbeenschade in een OA model (DAP2). Alleen stoffen in die omstandigheden een gunstige werking tonen zullen ook worden getest in een gewricht met alleen kraakbeenschade (DAP1 staat model voor trauma) en in een gewricht met kraakbeenschade en ontsteking (DAP3 staat model voor schade binnen artritis).

Diermodellen

Kraakbeenrepair model (gebruikt in alle drie de animal procedures)

In dit model wordt met een naald een full-thickness defect (gaatje tot in het onderliggende bot) gemaakt in gewrichtskraakbeen van de patellaire groef in het bovenbeen, juist onder de patella (knieschijf). Om die plaats te bereiken wordt de huid geopend en ook wordt een kleine snede gemaakt in het gewrichtskapsel, waarbij de ligamenten intact blijven. Na luxatie van de patella kan het gaatje aangebracht worden. Dit alles gebeurt onder narcose met pijnstilling. Na de operatie worden het gewrichtskapsel en de huid gehecht. In dit model bestuderen we kraakbeenherstel door eigen stamcellen die vrijkomen uit het beenmerg. Hiervoor dient het gaatje in het kraakbeen zo diep te zijn dat het onderliggende bot bereikt wordt.

DMM model (destabilisatie van de mediale meniscus; alleen gebruikt in animal procedure 2)

In het DMM model wordt, na luxatie van de patella, het ligament waarmee de mediale meniscus met het bot van de knie verbonden is, doorgesneden onder narcose, met pijnstilling. Na de operatie worden het gewrichtskapsel en de huid gehecht. Hierna zal initieel schade optreden aan de mediale zijde van de knie en later ook aan de laterale zijde. Dit is een model voor osteoartrose (OA) na bandletsel in de mens. De operatie procedure van dit model komt sterk overeen met de operatie procedure van het kraakbeenrepair model. In beide gevallen moet de patella opzij worden geschoven om vervolgens nog een kleine handeling in het vrijgekomen gebied te verrichten. Hierdoor kunnen beide modellen binnen één operatie worden gerealiseerd (zoals beschreven in DAP2), zonder extra overlast voor het dier. Op deze wijze kunnen we herstel van kraakbeenschade bestuderen in een OA gewricht, want uiteindelijk willen we graag OA patiënten helpen.

Ontstekingsmodel (alleen gebruikt in animal procedure 3)

Schade aan het gewricht trekt ontstekingscellen aan. Dat betekent dat kraakbeenherstel ook belemmerd kan worden door ontstekingsfactoren. Daarom willen we kraakbeenherstel ook bestuderen tegen een lichte ontstekingsachtergrond. In dit model wordt een ontstekingsprikkel zoals zymosan geïnjecteerd in het kniegewricht .

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

De hoofddoelstelling is het bevorderen van kraakbeenherstel door het remmen van nadelige intracellulaire signaalroutes in een geactiveerd gewricht. Kandidaat-stoffen die naar voren zijn gekomen bij in vitro voor-screening zullen worden getest op hun invloed op kraakbeenherstel in muizen met een aangebrachte kraakbeenschade in de patellaire groef. Omdat de voor-screening is gedaan in aanwezigheid van stoffen uit het OA

gewricht zal herstel van kraakbeenschade door deze remmers eerst worden onderzocht binnen een model voor OA (DAP2). Remmers met een gunstige werking in OA condities zullen ook worden toegediend binnen een model voor trauma (DAP1) of binnen een model voor kraakbeenschade bij artritis (DAP3) om te zien of er een meer algemene werking is bij activatie van gewrichten (dus buiten de OA situatie). Een go/no go beslissing is er dus na een test van een remmer binnen DAP2. Daarnaast is in vitro gebleken dat remming van TAK1 en JAK (zie 3.4.1) tegelijkertijd effectiever is dan de afzonderlijke remmers. Combinatie van TAK1 en JAK remming zouden we nu ook in vivo willen toepassen. De go/no go beslissing is in dit geval dat we alleen combinaties gaan uitvoeren als de afzonderlijke TAK1 en JAK remmers een gunstige werking laten zien.

Lijst animal procedures:

1. Bevordering kraakbeenherstel mbv kinase remmers
2. Bevordering kraakbeenherstel mbv kinase remmers in een osteoartrotisch gewricht
3. Bevordering kraakbeenherstel mbv kinase remmers in een ontstoken gewricht

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	Bevorderen van kraakbeenherstel mbv kinase remmers
2	Bevorderen van kraakbeenherstel mbv kinase remmers in een osteoartrotisch gewricht
3	Bevordering van kraakbeenherstel mbv kinase remmers in een ontstoken gewricht

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Bevorderen van kraakbeenherstel mbv kinase remmers

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.

Om herstel van gewrichtskraakbeen in vivo te kunnen bestuderen moet er op gestandaardiseerde wijze en op een standaard plaats een gaatje in het kraakbeen gemaakt worden. Kraakbeen in het kniegewricht van de muis is bijna niet te bereiken zonder grote schade aan de ondersteunende structuren. De plaats die het best te bereiken is, is de patellaire groef. Om toegang van mesenchymale stamcellen uit het eigen beenmerg mogelijk te maken zal het een door het kraakbeen heen in het onderliggende bot geprikt worden. Stoffen die in vitro positieve effecten op chondrogene differentiatie van stamcellen hebben zullen in dit model getest worden op hun in vivo werking. De kwaliteit van het kraakbeen op de plaats van de beschadiging zal na 8 weken histologisch worden bestudeerd aan de hand van sagittale doorsnedes van het kniegewricht. Muizenstammen met spontane kraakbeenregeneratie laten na 8 weken gedeeltelijk herstel van de beschadiging zien, terwijl de C57Bl/6 muis, die wij gebruiken, dit niet kan repareren. In eerste instantie zullen wij de C57Bl/6 muis gebruiken omdat ook de mens nauwelijks kraakbeenregeneratie laat zien bij full-thickness defecten (tot in het bot). In een pilot experiment hebben wij gezien dat na 8 weken vrijwel geen cellen waren te vinden in het defect, dus is er een risico dat deze muizenstam niet in staat is om stamcellen naar het kraakbeendefect te brengen en dat is wel een voorwaarde voor onze experimenten. Als blijkt dat onze meest veelbelovende proteïn kinase remmers niet in staat zijn om kraakbeenregeneratie te induceren zullen we overstappen op MRL/MpJ muizen, die in staat zijn tot spontane kraakbeenregeneratie (eerder genoemde studie Fitzgerald, 2008), of DBA/1 muizen die dit in mindere mate kunnen (eerder genoemde studie Eltawil, 2009). In een dergelijke stam kunnen we dan uitzoeken of het herstel wordt versneld door de kinase remmers.

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

In dit model wordt met een naald een gaatje gemaakt in gewrichtskraakbeen van de patellaire groef in het bovenbeen, juist onder de patella (knie-schijf). Om die plaats te bereiken wordt de huid geopend en ook wordt een kleine snede gemaakt in het gewrichtskapsel, waarbij de ligamenten intact blijven. Na luxatie van de patella kan het gaatje aangebracht worden. Dit alles gebeurt onder narcose met pijnstilling. Na de operatie worden het gewrichtskapsel en de huid gehecht. In dit model bestuderen we kraakbeenherstel door eigen stamcellen die vrijkomen uit het beenmerg. Hiervoor dient het gaatje in het kraakbeen zo diep te zijn dat het onderliggende bot bereikt wordt. In een klein eerste experiment hebben wij reeds gezien dat wij deze gaatjes reproduceerbaar kunnen aanbrengen zonder al te veel verstoring van het gewricht. Stoffen die in vitro chondrogenese bevorderen zullen worden toegediend via osmotische pompjes (onderhuids ingebracht), orale gavage 2x daags, gedurende 2 weken, of via het drinkwater. Om het gewricht na de operatie tot rust te laten komen (opruimen bloed restanten en ontstekingscellen) zullen we pas 3 dagen na de operatie starten met de toediening. Hoewel de osmotische pompjes na ongeveer 2 weken leeg zijn, laten we ze zitten tot het eindpunt

op 8 weken na de operatie (minste ongerief). Omdat we denken dat de eerste weken cruciaal zijn voor chondrogene differentiatie van stamcellen, achten we het niet nodig om na de eerste 2 weken nieuwe te plaatsen.

Hieronder de volgorde van de handelingen in de tijd voor deze procedure:

dag 0: openen gewricht en aanbrengen kraakbeenschade

dag 3: start toediening kinase remmer via osmotische pompjes, orale gavage of drinkwater

dag 56: kniegewricht voor histologie

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) per experimentele groep te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data kan worden verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power-analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt. Hierbij zal de volgende formule worden toegepast: $n = 1 + 2C(s/d)^2$. De C-waarde wordt berekend m.b.v. de power (1-β) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken worden (met de gewenste power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05) resulteert dit in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken worden zal een Bonferroni-correctie worden toegepast. De s- en d-waarden staan voor de geschatte standaarddeviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleid worden uit eerder uitgevoerde (pilot)experimenten of reeds gepubliceerde data.

B. The animals

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

Soort: Onderzoek naar kraakbeen kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem waarbij het kraakbeen in zijn natuurlijke omgeving blijft in een functionerend gewricht vergelijkbaar met de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een interactie tussen de weefsels in het gewricht die vergelijkbaar is met de mens en met een vergelijkbaar immuunsysteem.

Stam: De C57BL/6 muis toont net als de mens nauwelijks spontaan kraakbeenherstel. In eerdere studies aan kraakbeenherstel die ik heb gevonden, worden de gebruikte muizen nergens verder gedefinieerd dan C57Bl/6. Gezien de geringe instroom van cellen in het kraakbeendefect die we hebben gezien in een pilot experiment in de C57Bl/6 N die we normaal gebruiken, willen we in een eerste experiment kijken of er misschien meer instroom van stamcellen en spontaan kraakbeenherstel is in de C57Bl/6 J stam. Zoals eerder vermeld in paragraaf 3.4.1 van de Project Proposal zullen de experimenten in eerste instantie worden uitgevoerd met de C57Bl/6 muis die, net als de mens, nauwelijks spontaan herstel van kraakbeenschade laat zien. Een risico is dat onze in vitro voorscreening is gebaseerd op uitrijping van de stamcel, terwijl de niet herstellende muizenstam mogelijk op een eerder niveau faalt, zoals bij de recrutering van de stamcellen; we zagen immers in eerdere experimenten met C57Bl/6 muizen geen cellen binnenkomen in het kraakbeendefect. Daarom zullen we bij tegenvallende resultaten ook kijken of de proteïne kinase remmers herstel kunnen

versnellen in een muizenstam die het kraakbeen wél spontaan herstelt, zoals de DBA1 of de MRL/MpJ (gebruikt in de eerder genoemde studies van Fitzgerald 2008 en van Eltawil 2009). Dit is de reden dat we in de tabel hieronder geen muizenstam noemen.

Grootte exp. groep: Voor de bepaling van het juiste aantal dieren per experimentele groep kunnen we gebruik maken van de twee eerder genoemde studies waarin spontaan herstel van een kraakbeendefect werd vergeleken tussen de C57BL/6 muis en stammen die hun gewrichtskraakbeen gedeeltelijk kunnen herstellen (DBA/1 en MRL/MpJ). In deze studies was sprake van kleine effecten en grote spreidingen, waardoor voor de gewenste power groepen van 20 muizen noodzakelijk zijn. Hoewel in onze experimenten i.p.v. spontaan kraakbeenherstel, dit herstel wordt geïnduceerd door toediening van stoffen, moeten we in eerste instantie uitgaan van vergelijkbare effecten en spreidingen. Wanneer dat anders blijkt te liggen zullen we de grootte van de experimentele groepen reduceren.

Leeftijd en geslacht: In beide genoemde studies (Fitzgerald, 2008 en Eltawil, 2009) zijn mannetjes muizen van 8 weken gebruikt. Spontaan kraakbeen herstel bleek niet meer mogelijk in oudere dieren. Ook bleken mannetjes beter kraakbeenherstel te hebben dan vrouwtjes. Op basis van deze studies kiezen we voor mannetjes van 8 weken voor onze experimenten.

Schatting benodigd aantal dieren: Als we de invloed van een stof op kraakbeen herstel willen testen zullen we een optimale concentratie van die stof (berekend uit eigen in vitro experimenten en in vitro en in vivo experimenten in andere muis-modellen uit de literatuur) toedienen en dit vergelijken met het effect van het oplosmiddel (vaak DMSO of ethanol). Dat betekent dat we voor het testen van één stof $2 \times 20 = 40$ muizen nodig hebben. Op het moment hebben wij op basis van onze in vitro studies meerdere kandidaat stoffen (proteïn kinases) geselecteerd die afzonderlijk en of in combinatie getest kunnen worden m.b.t. kraakbeenregeneratie in de muizenknie. Zoals uitgelegd in paragraaf 3.4.1 van de Project Proposal zullen zo een tiental stoffen of combinaties van stoffen getest worden. Deze zullen allereerst getest worden in DAP2, dus bij kraakbeenschade binnen een osteoartrose model. Hiervoor zijn $10 \times 40 = 400$ muizen nodig. Pas wanneer onder die omstandigheden succes wordt geboekt zal een remmer of combinatie van remmers ook in de DAP1 (staat model voor kraakbeenherstel na trauma) getest worden. Als dat in 75% van de experimenten het geval zou zijn (zeer optimistische schatting) zouden 320 muizen nodig zijn voor tests in DAP1.

Een probleem is uitval van muizen vanwege de narcose. Het type operatie voor DAP1 lijkt sterk op operaties voor het DMM model voor osteoartrose (beschreven in DAP2), waar we veel ervaring mee hebben. In deze experimenten bleek grofweg 5% van de muizen te overlijden door de narcose. Wij willen daarom rekening houden met een uitval van 5% om te voorkomen dat we te weinig dieren overhouden om statistisch betrouwbare data te verkrijgen. Hierdoor denken we voor DAP1, op basis van de tot op heden geselecteerde remmers, $320 + 16 = 336$ muizen nodig te hebben.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mouse	Certified supplier	336	8 weken

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

C. Re-use

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Vervanging

Helaas is er op dit moment geen alternatief voor het bestuderen kraakbeenregeneratie in vivo. Kraakbeen wordt ook beïnvloed door het onderliggende bot, en het synovium dat factoren uitscheidt die ook het kraakbeen bereiken. Bovendien is het kraakbeen afhankelijk van beweging. Zonder beweging gaan belangrijke signaalroutes uit die het kraakbeen in stand houden. Daarom reageert kraakbeen zodra het uit zijn natuurlijke omgeving gehaald wordt anders dan in een gewricht.

Vermindering

De remmers van intracellulaire signalerings routes worden vooraf getest in ons in vitro screening systeem. Dit bespaart veel muizen, doordat het merendeel van de kandidaat-stoffen al afvalt vóór de in vivo experimenten in de muis. Bovendien is er een kans dat we op basis van de eerste experimenten het aantal dieren per experiment kunnen verminderen. In dit project is een schatting gemaakt van het aantal dieren dat nodig is om deze studie uit te voeren. Als blijkt dat de effecten groter en de spreidingen lager zijn dan de studies die wij als leidraad hebben genomen, zullen wij het aantal dieren per experimentele groep verminderen. De benodigde groepsgrootte van 20 dieren is aanzienlijk, maar helaas zijn er in de muis geen alternatieven voor de studie aan herstel van beschadigd gewrichtskraakbeen beschikbaar.

Verfijning

We hebben gezien dat muizen na de operaties al snel weer hun normale gedrag en motoriek terug hebben. Onze laboranten hebben veel ervaring met de benodigde operaties en zijn in staat om de schade aan het gewrichtskapsel tot een minimum te beperken (voorkomt instabiliteit gewricht) en bloedingen optimaal te stelpen. Hierdoor zullen wij er mogelijk in slagen om de spreiding in de uitkomsten terug te dringen.

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

Om welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn. Verder zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

n.v.t.

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.

Om pijn tijdens de operaties te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast, naast volledige anesthesie. Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden in de periode na de operatie. Dit kan namelijk effect hebben op het kraakbeen herstel, zowel rechtstreeks als door beïnvloeden van stoffen in het geactiveerde gewricht die wij juist bestuderen.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Verminderde beweeglijkheid of belastbaarheid van een geopereerde knie, waardoor de muis verminderde mobiliteit vertoont. De muizen worden behandeld met kinase remmers via osmotische pompjes die drie dagen na de eerste operatie onder narcose zullen worden ingebracht onder de huid (incisie + hechten). Een tweede operatie onder narcose in korte tijd geeft extra risico op overlijden door de narcose. Van de pompjes zelf lijken de muizen weinig last te hebben. In plaats van pompjes kunnen ook orale gavages (2xdaags over een periode van minimaal 2 weken) worden gebruikt om de remmers toe te dienen. Dit kan stress veroorzaken.

Explain why these effects may emerge.

Er is een geringe kans dat de knie door de operatie ontstoken raakt of als gevolg van het kraakbeendefect of vrijgekomen debris niet goed meer functioneert, waardoor een dier verminderde mobiliteit vertoont

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

Steriel werken tijdens de operatie is van belang om infecties te voorkomen (hoewel muizen weinig gevoelig voor infecties zijn gebleken tijdens dit type operaties)

Ook moet zorgvuldig worden geopereerd (minimale aantasting van gewrichtskapsel), omdat anders de stabiliteit van het gewricht te zeer aangetast wordt.

Ook moeten de gaatjes in het kraakbeen worden ontdaan van vrijgekomen materiaal, dat anders gaat zwerven in het gewricht.

Orale gavages moeten worden uitgevoerd door ervaren biotechnici, om stress en beschadiging te vermijden

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.

Normaliter wordt na een dergelijke operatie de geopereerde achterpoot de eerste 2 dagen nog wat ontzien, maar is er daarna weer een normaal looppatroon. Humane eindpunten zijn derhalve: op dag 2 na de operatie de poot niet belasten en herhaaldelijk blijven liggen. Soms overlijden muizen tijdens de narcose, of vrij snel erna. Muizen die een dag later nog steeds problemen hebben door de narcose en daarom uit experiment moeten worden genomen, zien we nooit, maar als het zou gebeuren dat een dier inactief is of evenwichtsstoornissen heeft 2 dagen na de operatie zullen we dat uit experiment nemen.

Indicate the likely incidence.

De kans op humaan eindpunt is zeer klein, naar alle waarschijnlijkheid veel kleiner dan 2%. In een pilot experiment waarin we op deze wijze kraakbeenschade induceerden, zagen we alleen de eerste 2 dagen een afwijkend looppatroon bij de behandelde muizen, en geen verdere problemen gedurende de rest van de periode van 8 weken. Ook de histologie op het eind van het experiment (8weken) toonde weinig gevolgen voor het gewricht, behalve een geringe mate van osteofyt vorming.

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).

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.

Het is noodzakelijk om het dier te doden om vervolgens weefsel te kunnen verwijderen voor verdere analyse.

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

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

Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 2	Type of animal procedure Bevorderen van kraakbeenherstel mbv kinase remmers in een osteoartrotisch gewricht

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.

Omdat in OA patiënten de behoefte aan kraakbeenreparatie erg groot is, is het belangrijk om stoffen die kraakbeenherstel induceren in vitro en in vivo, ook te testen in een OA model. De verwachting is, dat kraakbeenherstel in een OA gewricht extra moeilijk is, doordat de daar uitgescheiden factoren chondrogenese door stamcellen blokkeren, zoals dat onder andere in ons lab is aangetoond, in vitro. Om kraakbeenherstel te bestuderen in een OA achtergrond, moeten we in hetzelfde gewricht zowel kraakbeenschade als OA induceren. Gunstig is dat dit kan gebeuren in een en dezelfde operatie, zonder noemenswaardige vergroting van het ongerief voor de muis. Als de kraakbeenschade is aangebracht volgens animal procedure nummer 1, aanbrengen kraakbeenschade, is ook zicht op het ligament dat moet worden doorgesneden voor het DMM artrose model. Ook na deze experimenten met kraakbeen repair in een OA omgeving zal na 8 weken de histologische analyse van kraakbeen herstel het criterium zijn waarop de werkzaamheid van beschermende stoffen wordt beoordeeld.

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

In DAP2 wordt, net als in DAP1, met een naald een gaatje gemaakt in gewrichtskraakbeen van de patellaire groef in het bovenbeen, juist onder de patella (knie-schijf). Om die plaats te bereiken wordt de huid geopend en ook wordt een kleine snede gemaakt in het gewrichtskapsel, waarbij de ligamenten intact blijven. Na luxatie van de patella kan het gaatje aangebracht worden. Dit alles gebeurt onder narcose met pijnstilling. Na de operatie worden het gewrichtskapsel en de huid gehecht. In dit model bestuderen we kraakbeenherstel door eigen stamcellen die vrijkomen uit het beenmerg. Hiervoor dient het gaatje in het kraakbeen zo diep te zijn dat het onderliggende bot bereikt wordt. In een klein eerste experiment hebben wij reeds gezien dat wij deze gaatjes reproduceerbaar kunnen aanbrengen zonder al te veel verstoring van het gewricht.

Als de het gewricht is geopend en de kraakbeenschade is aangebracht, is ook zicht op het ligament dat moet worden doorgesneden voor het DMM (destabilisatie van mediale meniscus) osteoartrose(OA) model. Kraakbeenschade en gewrichtsinstabiliteit voor het DMM model zullen dus binnen dezelfde operatie worden aangebracht. Om het DMM model voor OA te induceren wordt d.m.v. een operatie onder anesthesie het gewrichtskapsel geopend om, na luxatie van de patella, het ligament waarmee de mediale meniscus aan de tibia is verbonden door te snijden. Vervolgens worden het kapsel en de huid gehecht. Deze technieken worden door onze medewerkers routinematig uitgevoerd. Na de operatie zal in de loop van 8 weken schade ontstaan door gewrichtsinstabiliteit. Dit artrose model gaat met weinig ontsteking gepaard.

Proteïn kinase remmers die die in vitro chondrogenese bevorderen zullen worden toegediend via osmotische pompjes (onderhuids ingebracht), orale gavage 2x daags, gedurende 2 weken, of via het drinkwater. Om het gewricht na de operatie tot rust te laten komen (opruimen bloed restanten en ontstekingscellen) zullen we pas 3 dagen na de operatie starten met de toediening. Hoewel de osmotische pompjes na ongeveer 2 weken leeg zijn,

laten we ze zitten tot het eindpunt op 8 weken na de operatie (minste ongerief). Omdat we denken dat de eerste weken cruciaal zijn voor chondrogene differentiatie van stamcellen, achten we het niet nodig om na de eerste 2 weken nieuwe te plaatsen.

Hieronder de volgorde van de handelingen in de tijd bij animal procedure 2:

dag 0: openen gewricht en aanbrengen kraakbeenschade + doorsnijden ligament mediale meniscus (instabiliteit gewricht)

dag 3: start toediening kinase remmer via osmotische pompjes, orale gavage of drinkwater

dag 56: kniegewricht voor histologie

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) per experimentele groep te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data kan worden verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power-analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt. Hierbij zal de volgende formule worden toegepast: $n=1+2C(s/d)^2$

De C-waarde wordt berekend m.b.v. de power ($1-\beta$) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken worden (met de gewenste power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05) resulteert dit in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken worden zal een Bonferroni-correctie worden toegepast. De s- en d-waarden staan voor de geschatte standaarddeviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleid worden uit eerder uitgevoerde (pilot)experimenten of reeds gepubliceerde data.

B. The animals

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

Soort: Onderzoek naar kraakbeen kan het beste worden uitgevoerd in een modelsysteem waarbij het kraakbeen in zijn natuurlijke omgeving blijft in een functionerend gewricht vergelijkbaar met de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een interactie tussen de weefsels in het gewricht die vergelijkbaar is met de mens en met een vergelijkbaar immuunsysteem. Muizen ontwikkelen net als de mens ook spontaan artrose. Aangezien het DMM model wordt gebruikt om een OA achtergrond te verkrijgen binnen de kraakbeenherstel studies, zijn muizenstam, geslacht, en leeftijd gelijk aan die in animal procedure 1.

Grootte exp. groep: Voor de bepaling van het juiste aantal dieren per experimentele groep kunnen we gebruik maken van de twee eerder genoemde studies waarin spontaan herstel van een kraakbeendefect werd vergeleken tussen de C57BL/6 muis en stammen die hun gewrichtskraakbeen

gedeeltelijk kunnen herstellen (DBA/1 en MRL/MpJ). In deze studies was sprake van kleine effecten en grote spreidingen, waardoor voor de gewenste power groepen van 20 muizen noodzakelijk zijn. Hoewel in onze experimenten i.p.v. spontaan kraakbeenherstel, dit herstel wordt geïnduceerd door toediening van stoffen, moeten we in eerste instantie uitgaan van vergelijkbare effecten en spreidingen. Wanneer dat anders blijkt te liggen zullen we de grootte van de experimentele groepen reduceren. Ons lab heeft veel ervaring met het DMM model. De grootte van de experimentele groepen is voor DMM normaal gesproken 8, op basis van eerdere experimenten (bij DMM gaan we uit van een standaard deviatie van 13 en een verschil van 20%, wat neerkomt op een n=waarde van 7,6. Dus afgerond 8 muizen per groep). Echter, de groepsgrootte wordt in dit geval bepaald door de mate van kraakbeenherstel, waarbij DMM zorgt voor een relevante activatie van het gewricht. De groepsgrootte zal dus zeker 20 dieren moeten zijn, zoals berekend voor DAP1 aan de hand van de beschikbare literatuur. Het valt niet te voorspellen of door de toevoeging van OA door het DMM model, aan animal procedure 1, de minimale grootte van de experimentele groepen nog moet worden verhoogd, dus houden we in eerste instantie ook in de combinatie een groepsgrootte van 20 dieren aan. Voor 1 experiment zijn dan 40 muizen nodig (20 met kinase remmer en 20 controle = alleen het oplosmiddel).

Op het moment hebben wij uit voorafgaande in vitro experimenten meerdere kandidaat stoffen (kinase remmers) geselecteerd die ook nog in combinatie getest kunnen worden. Zoals uitgelegd in paragraaf 3.4.1 van de Project Proposal zullen zo een tiental stoffen of combinaties van stoffen getest worden. Deze zullen allereerst getest worden in DAP2, dus bij kraakbeenschade binnen een osteoartrose model. Hiervoor zijn 10x40=400 muizen nodig.

Een probleem is uitval van muizen vanwege de narcose. Bij de operaties voor het DMM model voor osteoartrose, waar we veel ervaring mee hebben, blijkt grofweg 5% van de muizen te overlijden door de narcose. Dat zal niet anders zijn nu we in DAP2 binnen een operatie zowel kraakbeenschade als DMM induceren. Wij willen daarom rekening houden met een uitval van 5% om te voorkomen dat we te weinig dieren overhouden om statistisch betrouwbare data te verkrijgen. Hierdoor denken we voor DAP2, op basis van de tot op heden geselecteerde remmers, 400 + 20 = 420 muizen nodig te hebben.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mouse	Certified supplier	420	8 weeks

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

Helaas is er op dit moment geen alternatief voor het bestuderen van artrose. Dit proces is een samenspel tussen alle weefsels in het gewricht, die ieder hun bijdrage leveren. Kraakbeenschade is het belangrijkste proces, maar dit wordt ook beïnvloed door het onderliggende bot, en het synovium dat factoren uitscheidt die ook het kraakbeen bereiken. Bovendien is het kraakbeen afhankelijk van beweging. Zonder beweging gaan belangrijke signaalroutes uit die het kraakbeen in stand houden. Daarom reageert kraakbeen zodra het uit zijn natuurlijke omgeving gehaald wordt anders dan in een gewricht. Muizen zijn de "laagste" zoogdieren die gewrichten hebben die artrose ontwikkelen zoals in de mens en waarin dus ook het proces van kraakbeenherstel tijdens artrose bestudeerd kan worden.

Vermindering

De remmers van intracellulaire signalerings routes worden vooraf getest in ons in vitro screening systeem. Dit bespaart veel muizen, doordat het merendeel van de kandidaat-stoffen al afvalt vóór de in vivo experimenten in de muis. Bovendien is er een kans dat we op basis van de eerste experimenten het aantal dieren per experiment kunnen verminderen. In dit project is een schatting gemaakt van het aantal dieren dat nodig is om deze studie uit te voeren. Als blijkt dat de effecten groter en de spreidingen lager zijn dan de studies die wij als leidraad hebben genomen, zullen wij het aantal dieren per experimentele groep verminderen. De benodigde groepsgrootte van 20 dieren is aanzienlijk, maar helaas zijn er in de muis geen alternatieven voor de studie aan herstel van beschadigd gewrichtskraakbeen beschikbaar.

Verfijning

Tijdens artrose zullen de muizen pijn ervaren. Pijn is echter een wezenlijk aspect van artrose en zal invloed hebben op het al dan niet belasten van gewrichten. Deze belasting speelt weer een rol in het ontstaan van pathologie. In het DMM-model is gevonden dat pijn pas heel laat in het model detecteerbaar is (start 16-17 weken na inductie). Binnen de 2 maanden van onze experimenten is met de huidige technieken geen verhoogde pijngevoeligheid of wijziging van looppatroon aantoonbaar. We hebben gezien dat de muizen na de operatie al snel weer hun normale gedrag en motoriek terug hebben. Onze laboranten hebben veel ervaring met de benodigde operaties en zijn in staat om de schade aan het gewrichtskapsel tot een minimum te beperken (voorkomt instabiliteit gewricht) en bloedingen optimaal te stelpen. Hierdoor zullen wij er mogelijk in slagen om de spreiding in de uitkomsten terug te dringen.

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

Om welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn. Verder zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

n.v.t.

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.

Om pijn tijdens de operaties te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast, naast volledige anesthesie.

Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens de ontwikkeling van artrose. Dit kan nl. een effect hebben op het verloop van de artrose, en op de stoffen die het gewricht maakt die invloed hebben op kraakbeenherstel.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Verminderde beweeglijkheid of belastbaarheid van een geopereerde knie, waardoor de muis verminderde mobiliteit vertoont.

De muizen worden behandeld met kinase remmers via osmotische pompjes die drie dagen na de eerste operatie onder narcose zullen worden ingebracht onder de huid (incisie + hechten). Een tweede operatie onder narcose in korte tijd geeft extra risico op overlijden door de narcose. Van de pompjes zelf lijken de muizen weinig last te hebben. In plaats van pompjes kunnen ook orale gavages (2xdaags over een periode van minimaal 2 weken) worden gebruikt om de remmers toe te dienen. Dit kan stress veroorzaken.

Explain why these effects may emerge.

Er is een geringe kans dat de knie door de operatie ontstoken raakt of als gevolg van het deels losmaken van de mediale meniscus niet goed meer functioneert, waardoor een dier verminderde mobiliteit vertoont

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

Steriel werken tijdens de operatie is van belang om infecties te voorkomen

(hoewel muizen weinig gevoelig voor infecties zijn gebleken tijdens dit type operaties)

Ook moet zorgvuldig worden geopereerd (minimale aantasting van gewrichtskapsel), omdat anders de stabiliteit van het gewricht te zeer aangetast wordt.

Orale gavages moeten worden uitgevoerd door ervaren biotechnici, om stress en beschadiging te vermijden

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.

Normaliter wordt na een dergelijke operatie de geopereerde achterpoot de eerste 2 dagen nog wat ontzien, maar is er daarna weer een normaal looppatroon. Humane eindpunten zijn derhalve: op dag 2 na de operatie de poot niet belasten en herhaaldelijk blijven liggen. Soms overlijden muizen tijdens de narcose, of vrij snel erna. Muizen die een dag later nog steeds problemen hebben door de narcose en daarom uit experiment moeten worden genomen, zien we nooit, maar als het zou gebeuren dat een dier inactief is of evenwichtsstoornissen heeft 2 dagen na de operatie zullen we dat uit experiment nemen.

Indicate the likely incidence.

De kans op humaan eindpunt is zeer klein. naar alle waarschijnlijkheid veel kleiner dan 2%. In een pilot experiment waarin we op deze wijze kraakbeenschade induceerden, zagen we alleen de eerste 2 dagen een afwijkend looppatroon bij de behandelde muizen, en geen verdere problemen gedurende de rest van de periode van 8 weken. Ook de histologie op het eind van het experiment (8weken) toonde weinig gevolgen voor het gewricht, behalve een geringe mate van osteofyt vorming. Ook in het DMM model zien we alleen in de eerste 2 dagen na de operatie een afwijkend looppatroon en is na 8 weken de gewrichtsschade doorgaans nog zeer mild. Van de combinatie kraakbeenschade + inductie van DMM verwachten we geen extra problemen, omdat binnen dezelfde operatie om het gewricht te openen een prikje in het kraakbeen en het doorsnijden van een klein ligament weinig extra schade toevoegen.

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).

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.

Het is noodzakelijk om het dier te doden om vervolgens weefsel te kunnen verwijderen voor verdere analyse.

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

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

Yes

Appendix**Description animal procedures**

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure Bevordering van kraakbeenherstel mbv kinase remmers in een ontstoken gewricht

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.

Schade aan het gewricht trekt ontstekingscellen aan, zoals PMNs en macrofagen. Dat betekent dat kraakbeenherstel ook belemmerd kan worden door ontstekingsfactoren. Daarom willen proteïn kinases die kraakbeenherstel door stamcellen blijken te bevorderen in animal procedure 2, ook bestuderen tegen een lichte ontstekingsachtergrond. In animal procedure 3 wordt een ontstekingsprikkel zoals zymosan intra-articulair geïnjecteerd in een kniegewricht met een kraakbeenbeschadiging. Ook na deze experimenten met kraakbeen repair in een door lichte ontsteking geactiveerd gewricht zal na 8 weken de histologische analyse van kraakbeen herstel het criterium zijn waarop de werkzaamheid van beschermende stoffen wordt beoordeeld.

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

In DAP3 wordt, net als in DAP1 en DAP2, met een naald een gaatje gemaakt in gewrichtskraakbeen van de patellaire groef in het bovenbeen, juist onder de patella (knieschijf). Om die plaats te bereiken wordt de huid geopend en ook wordt een kleine snede gemaakt in het gewrichtskapsel, waarbij de ligamenten intact blijven. Na luxatie van de patella kan het gaatje aangebracht worden. Dit alles gebeurt onder narcose met pijnstilling. Na de operatie worden het gewrichtskapsel en de huid gehecht. In dit model bestuderen we kraakbeenherstel door eigen stamcellen die vrijkomen uit het beenmerg. Hiervoor dient het gaatje in het kraakbeen zo diep te zijn dat het onderliggende bot bereikt wordt. In een klein eerste experiment hebben wij reeds gezien dat wij deze gaatjes reproduceerbaar kunnen aanbrengen zonder al te veel verstoring van het gewricht.

Proteïn kinase remmers die in vitro chondrogenese bevorderen zullen worden toegediend via osmotische pompjes (onderhuids ingebracht), orale gavage 2x daags, gedurende 2 weken, of via het drinkwater. Om het gewricht na de operatie tot rust te laten komen (opruimen bloed restanten en ontstekingscellen) zullen we pas 3 dagen na de operatie starten met de toediening. Hoewel de osmotische pompjes na ongeveer 2 weken leeg zijn, laten we ze zitten tot het eindpunt op 8 weken na de operatie (minste ongerief). Omdat we denken dat de eerste weken cruciaal zijn voor chondrogene differentiatie van stamcellen, achten we het niet nodig om na de eerste 2 weken nieuwe te plaatsen.

Muizen met aangebrachte kraakbeenschade in de knie zullen gelijk met de implantatie van osmotische pompjes (dus 3 dagen na aanbrengen van kraakbeenschade) intra-articulair worden ingespoten met een lage dosering zymosan of een andere ontstekingsprikkel. Bij deze techniek wordt een kleine snede gemaakt in de huid en de ontstekingsfactor door het kapsel in het gewricht gespoten. De techniek wordt door onze medewerkers routinematig uitgevoerd. Aangezien zymosan slechts een kortdurende lichte ontsteking veroorzaakt wordt de injectie drie maal herhaald met tussenpozen van twee dagen, zodat in ieder geval in de eerste weken, waarschijnlijk een belangrijke fase voor de uitrijping van stamcellen in het defect, lichte ontsteking aanwezig is.

Hieronder de volgorde van de handelingen in de tijd bij animal procedure 3:

dag 0: openen gewricht en aanbrengen kraakbeenschade

dag 3: start toediening kinase remmer via osmotische pompjes, orale gavage of drinkwater

dag 3, dag 5, dag 7, dag 9 intra-articulaire injecties ontstekingsprikkel

dag 56: kniegewricht voor histologie

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) per experimentele groep te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data kan worden verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power-analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt. Hierbij zal de volgende formule worden toegepast: $n = 1 + 2C(s/d)^2$. De C-waarde wordt berekend m.b.v. de power ($1 - \beta$) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken worden (met de gewenste power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05) resulteert dit in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken worden zal een Bonferroni-correctie worden toegepast. De s- en d-waarden staan voor de geschatte standaarddeviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleid worden uit eerder uitgevoerde (pilot)experimenten of reeds gepubliceerde data.

B. The animals

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

Soort: Onderzoek naar kraakbeen kan het beste worden uitgevoerd in een modelsysteem waarbij het kraakbeen in zijn natuurlijke omgeving blijft in een functionerend gewricht vergelijkbaar met de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een interactie tussen de weefsels in het gewricht die vergelijkbaar is met de mens en met een vergelijkbaar immuunsysteem. Omdat we in DAP3 intra-articulaire injecties van een lichte ontstekingsprikkel gebruiken om een door ontsteking geactiveerd gewricht te verkrijgen binnen de kraakbeenherstel studies, zijn muizenstam, geslacht, en leeftijd gelijk aan die in animal procedure 1, aanbrengen van kraakbeenschade.

Grootte exp. groep: Voor de bepaling van het juiste aantal dieren per experimentele groep kunnen we gebruik maken van de twee eerder genoemde studies waarin spontaan herstel van een kraakbeendefect werd vergeleken tussen de C57BL/6 muis en stammen die hun gewrichtskraakbeen gedeeltelijk kunnen herstellen (DBA/1 en MRL/MpJ). In deze studies was sprake van kleine effecten en grote spreidingen, waardoor voor de gewenste power groepen van 20 muizen noodzakelijk zijn. Hoewel in onze experimenten i.p.v. spontaan kraakbeenherstel, dit herstel wordt geïnduceerd door toediening van stoffen, moeten we in eerste instantie uitgaan van vergelijkbare effecten en spreidingen. Wanneer dat anders blijkt te liggen zullen we de grootte van de experimentele groepen reduceren. De grootte van de experimentele groepen is bij intra-articulaire injecties van ontstekingsfactoren normaal gesproken 10 dieren, op basis van eerdere experimenten. Echter, de groepsgrootte wordt in dit geval bepaald door de mate van kraakbeenherstel, waarbij de ontstekingsfactor zorgt voor een relevante activatie van het gewricht. Voor animal procedure 1 is de vanuit de beschikbare literatuur de minimale groepsgrootte van 20 bepaald. De groepsgrootte zal dus zeker 20 dieren moeten zijn. Het valt niet te voorspellen of door de toevoeging van ontsteking aan animal procedure 1, de minimale grootte van de experimentele groepen nog moet worden verhoogd, dus houden we in eerste instantie ook in de combinatie een groepsgrootte van 20 dieren aan. Voor 1 experiment zijn dan 40 muizen nodig (20 met kinase remmer en 20 controle = alleen het oplosmiddel). Op het moment hebben wij op basis van onze in vitro studies meerdere kandidaat stoffen (proteïn kinases) geselecteerd die afzonderlijk en of in combinatie getest kunnen worden m.b.t. kraakbeenregeneratie in de muizenknie. Zoals uitgelegd in paragraaf 3.4.1 van de Project Proposal zullen zo een tiental stoffen of combinaties van stoffen getest worden. Deze zullen allereerst getest worden in DAP2, dus bij kraakbeenschade binnen een osteoartrose model. Hiervoor zijn $10 \times 40 = 400$ muizen nodig. Pas wanneer onder die omstandigheden succes wordt geboekt zal een remmer of combinatie van remmers ook in DAP3 (staat model voor kraakbeenherstel tegen een ontstekingsachtergrond) getest worden. Als dat in 75% van de experimenten het geval zou zijn (zeer optimistische schatting) zouden 320 muizen nodig zijn voor tests in DAP3.

Een probleem is uitval van muizen vanwege de narcose. Het type operatie voor DAP1 lijkt sterk op dat van DAP2 (DMM model voor osteoartrose), waar we veel ervaring mee hebben. In deze experimenten bleek grofweg 5% van de muizen te overlijden door de narcose. Wij willen daarom rekening houden met een uitval van 5% om te voorkomen dat we te weinig dieren overhouden om statistisch betrouwbare data te verkrijgen. Hierdoor denken we voor DAP3, op basis van de tot op heden geselecteerde remmers, $320 + 16 = 336$ muizen nodig te hebben.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mouse	Certified supplier	336	8 weken

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.

Vervanging

Helaas is er op dit moment geen alternatief voor het bestuderen van kraakbeenregeneratie in vivo. Kraakbeen wordt ook beïnvloed door het onderliggende bot, en het synovium dat factoren uitscheidt die ook het kraakbeen bereiken. Bovendien is het kraakbeen afhankelijk van beweging. Zonder beweging gaan belangrijke signaalroutes uit die het kraakbeen in stand houden. Daarom reageert kraakbeen zodra het uit zijn natuurlijke omgeving gehaald wordt anders dan in een gewricht.

Vermindering

De remmers van intracellulaire signalerings routes worden vooraf getest in ons in vitro screening systeem. Dit bespaart veel muizen, doordat het merendeel van de kandidaat-stoffen al afvalt vóór de in vivo experimenten in de muis. Bovendien is er een kans dat we op basis van de eerste experimenten het aantal dieren per experiment kunnen verminderen. In dit project is een schatting gemaakt van het aantal dieren dat nodig is om deze studie uit te voeren. Als blijkt dat de effecten groter en de spreidingen lager zijn dan de studies die wij als leidraad hebben genomen, zullen wij het aantal dieren per experimentele groep verminderen. De benodigde groepsgrootte van 20 dieren is aanzienlijk, maar helaas zijn er in de muis geen alternatieven voor de studie aan herstel van beschadigd gewrichtskraakbeen beschikbaar.

Verfijning

We hebben gezien dat muizen na de operaties al snel weer hun normale gedrag en motoriek terug hebben. Onze laboranten hebben veel ervaring met de benodigde operaties en zijn in staat om de schade aan het gewrichtskapsel tot het uiterste te beperken (voorkomt instabiliteit gewricht) en bloedingen optimaal te stelpen. Hierdoor zullen wij er mogelijk in slagen om de spreiding in de uitkomsten terug te dringen.

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

Om welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn. Verder zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

n.v.t.

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.

Om pijn tijdens de operaties te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast, naast volledige anesthesie. Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens kraakbeen repair in een licht ontstoken gewricht. Dit kan namelijk effect hebben op het kraakbeen herstel, zowel rechtstreeks als door beïnvloeden van stoffen in het geactiveerde gewricht die wij juist bestuderen.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Verminderde beweeglijkheid of belastbaarheid van een geopereerde knie, waardoor de muis verminderde mobiliteit vertoont. Na een injectie van de ontstekingsprikkel kan de muis zich ook korte tijd ziek voelen (koorts, ineengedoken, haren overeind).

De muizen worden behandeld met kinase remmers via osmotische pompjes die drie dagen na de eerste operatie onder narcose zullen worden ingebracht onder de huid (incisie + hechten). Een tweede operatie onder narcose in korte tijd geeft extra risico op overlijden door de narcose. Van de pompjes zelf lijken de muizen weinig last te hebben. In plaats van pompjes kunnen ook orale gavages (2xdaags over een periode van minimaal 2 weken) worden gebruikt om de remmers toe te dienen. Dit kan stress veroorzaken.

Explain why these effects may emerge.

Er is een geringe kans dat de knie door de operatie ontstoken raakt of als gevolg van het kraakbeendefect of vrijgekomen debris niet goed meer functioneert, waardoor een dier verminderde mobiliteit vertoont. Hoewel wij een geringe dosis van de ontstekingsprikkel inspuiten kan de muis zich misschien toch kort een beetje ziek voelen.

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

Steriel werken tijdens de operatie is van belang om infecties te voorkomen (hoewel muizen weinig gevoelig voor infecties zijn gebleken tijdens dit type operaties)
Ook moet zorgvuldig worden geopereerd (minimale aantasting van gewrichtskapsel), omdat anders de stabiliteit van het gewricht te zeer aangetast wordt.
Ook moeten de gaatjes in het kraakbeen worden ontdaan van vrijgekomen materiaal, dat anders gaat zwerven in het gewricht.
Orale gavages moeten worden uitgevoerd door ervaren biotechnici, om stress en beschadiging te vermijden

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.

Normaliter wordt na een dergelijke operatie de geopereerde achterpoot de eerste 2 dagen nog wat ontzien, maar is er daarna weer een normaal looppatroon. Humane eindpunten zijn derhalve: op dag 2 na de operatie de poot niet belasten en herhaaldelijk blijven liggen. Soms overlijden muizen tijdens de narcose, of vrij snel erna. Muizen die een dag later nog steeds problemen hebben door de narcose en daarom uit experiment moeten worden genomen, zien we nooit, maar als het zou gebeuren dat een dier inactief is of evenwichtsstoornissen heeft 2 dagen na de operatie zullen we dat uit experiment nemen.

Indicate the likely incidence.

De kans op humaan eindpunt is zeer klein, naar alle waarschijnlijkheid veel kleiner dan 2%. In een pilot experiment waarin we op deze wijze kraakbeenschade induceerden, zagen we alleen de eerste 2 dagen een afwijkend looppatroon bij de behandelde muizen, en geen verdere problemen

gedurende de rest van de periode van 8 weken. Ook de histologie op het eind van het experiment (8weken) toonde weinig gevolgen voor het gewricht, behalve geringe mate van osteofyt vorming.

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).

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.

Het is noodzakelijk om het dier te doden om vervolgens weefsel te kunnen verwijderen voor verdere analyse.

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

Een aantal van de te testen remmers wordt immers al gebruikt voor behandeling van verschillende aandoeningen van de mens. Zowel basaal als translationeel zijn nu aangekruist

-3.1: Het blijft onduidelijk en zelfs onbesproken welke remmers onderzocht zullen worden en waarom de onderzoekers juist deze remmers willen bestuderen.

Antwoord: We hebben inderdaad alleen de te remmen signaalroutes benoemd en niet de gebruikte remmers. Ik heb nu de remmers die naar voren kwamen uit de aangehaalde studie expliciet genoemd.

-3.2: De doelstelling is erg algemeen gesteld. Welke signaleringsroutes zullen geremd worden en met welke remmers? (zie ook de vraag over 3.1)

Antwoord: Hier wordt nu terugverwezen naar de aangebracht verduidelijking in §3.1.

-3.3 Het maatschappelijke belang is voldoende toegelicht. De onderzoekers geven aan dat het basaal onderzoek betreft, maar toch ontbreekt een omschrijving van het wetenschappelijk belang van dit onderzoek.

Antwoord: Het wetenschappelijk belang zoals verwoord in beantwoording van de vraag over §2.1 is nu aangegeven.

-3.4: De in vitro experimenten die voorafgaan aan de experimenten zijn eigenlijk een wezenlijk onderdeel van deze onderzoekslijn. Ze zouden daarom uitgebreider beschreven kunnen worden in deze aanvraag, zodat duidelijker is welke selectie er plaatsvindt voordat stoffen getest worden in de dierproeven.

Antwoord: De in vitro experimenten die ten grondslag liggen aan de dierexperimenten zijn beschreven in §3.1, met vermelding van twee referenties. Ik heb op uw verzoek hier nu tevens vermeld dat bescherming van chondrogene differentiatie door de remmers werd beoordeeld op basis van histologie en mate van depositie van proteoglycanen (kraakbeen-specifieke extracellulaire matrix moleculen).

-3.4.1: De onderzoekers zullen drie diermodellen gebruiken die elk in een aparte DAP staan beschreven. Alle geselecteerde stoffen zullen eerst in het model van DAP1 worden getest, waarna veelbelovende remmers hetzij in het model van DAP2, hetzij in het model van DAP3 getest zullen worden. De commissie begrijpt niet goed waarop de keuze voor één van beide modellen wordt gebaseerd, en waarom al bij voorbaat wordt uitgesloten dat bepaalde veelbelovende remmers in beide modellen getest worden.

Antwoord: Blijkbaar is het onduidelijk opgeschreven, maar het was niet de bedoeling om na succes in DAP1, voor verdere tests DAP2 of DAP3 uit te sluiten. Ook in verband met uw volgende vraag is besloten §3.4.1 grondig te herzien. Het is inderdaad zo dat de in vitro voorscreening is uitgevoerd in een osteoartrotisch milieu. We hadden in eerste instantie bedacht dat de lichte osteoartrotische verschijnselen na de operatie in de C57Bl/6 een goede opstap zouden vormen bij de in vivo experimenten, maar bij nader inzien is toch een start in de combinatie van DAP1 en DAP2, dus binnen een gevalideerd OA model, te prefereren. Niet alleen omdat dit klinisch relevanter is, maar ook omdat we de mogelijkheid open willen houden om een andere, minder OA-gevoelige muizenstam te gaan gebruiken, als de C57Bl/6 muis niet geschikt blijkt voor deze studies. Door deze verandering in research strategy zijn volgordes ook veranderd in §3.4.2 en §3.4.3.

-3.4.1: In aanvulling op de vorige vraag: in het model van DAP1 is er geen osteoartrose, terwijl de bevinding is dat de uitrijping van stamcellen juist wordt geblokkeerd in een osteoartrotische omgeving. Er wordt aangenomen dat er een licht artrotisch milieu ontstaat door het aanbrengen van een kraakbeenlaesie bij de C57Bl/6 muis. Treedt in dit milieu de

inhibitie van uitrijping van stamcellen plaats? De rationale voor het gebruik van het diermodel zoals beschreven in DAP1 is onvoldoende toegelicht. Is dit een valide model voor de klinische situatie? Waarom is het niet afdoende om de remmers te testen in de modellen van DAP2 en DAP3, die de klinische situatie beter benaderen? Het ongerief voor de dieren is niet groter in DAP2 en DAP3 dan in DAP1, en het zou een besparing van dieren kunnen betekenen.

Antwoord: Zie de beantwoording van de vorige vraag. Uw opmerkingen hebben geleid tot een grondige herziening van §3.4.1.

Description of Animal Procedures:

***DAP1**

-A2: Bedoelen de onderzoekers orale gavage waar zij orale toediening opschrijven? Welke frequentie van deze toediening verwachten de onderzoekers?

Antwoord: Inderdaad wordt orale gavage bedoeld; dit is aangepast. De remmers zouden 2x daags moeten worden toegediend.

-A2: Blijven de osmotische pompjes 8 weken werken? Een omschrijving van het aanbrengen en eventueel vervangen van de pompjes ontbreekt.

Antwoord: De osmotische pompjes zullen ongeveer een maand werken. Dit is geen bezwaar aangezien wij denken dat de eerste weken van de behandeling voldoende zijn om uitrijping van stamcellen mogelijk te maken. De pompjes kunnen daarna gewoon blijven zitten. De DEC merkt terecht op dat wij het aanbrengen van de pompjes niet omschreven hebben. Dit is nu in alle drie de DAPs toegevoegd.

-B: De groepsgrootte lijkt vrij fors. Zijn de kleine effecten die de onderzoekers willen opsporen nog wel klinisch relevant?

Antwoord: Wij moeten onze groepsgroottes baseren op wat bekend is in de literatuur. Daar vinden we echter alleen studies die spontaan kraakbeenherstel vergelijken. Daar zijn grote groepen nodig vanwege kleine effecten en grote spreidingen. Hopelijk valt dat beter uit in onze experimenten, waarin we spontaan herstel hopen te stimuleren. In dat geval maken we de groepen kleiner. En inderdaad: hoe duidelijker de effecten, hoe relevanter ze zijn.

-B: De onderzoekers noemen 5 tot 25% uitval door de narcose. De commissie vindt 25% uitval door de narcose niet acceptabel. Wanneer dit slechts éénmaal is voorgekomen en de oorzaak hiervan inmiddels is achterhaald, dan is dit geen afspiegeling van de normale praktijk. In dat geval worden de onderzoekers verzocht dit anders te formuleren. De commissie vindt 5% extra dieren vanwege uitval door de narcose realistischer hoewel nog steeds aan de forse kant. De onderzoekers worden verzocht het aantal extra gevraagde dieren aan te passen.

Antwoord: Het is juist dat de uitval door de narcose meestal lager ligt, rond 5%. Het narcosemiddel waarmee wij ervaring hebben, ffx, gaf af en toe boven de 10% sterfte, en als dat allemaal in dezelfde experimentele groep terecht komt is dat een ramp. Inmiddels blijkt dexdomitor + ketamine de nieuwe narcose procedure te zijn en daar hebben wij geen ervaring mee. Bij navraag bij de biotechnici bleek dat 5% uitval ook bij het nieuwe middel als reële schatting wordt gezien. Het aantal extra gevraagde dieren is op basis van deze informatie aangepast.

-B: De berekening van het aantal dieren is gebaseerd op de beschikbare mankracht in plaats van op het design van de experimenten die nodig zijn om het doel van de projectaanvraag te behalen. De overwegingen die meespelen bij de keuzes voor het testen van een combinatie

van remmers en het testen van een extra dosering zijn niet vermeld. De onderzoekers worden verzocht de onderbouwing voor het aantal dieren aan te passen.

Antwoord: De berekeningen zijn nu uitgevoerd op basis van de concrete experimenten met de remmers die we op grond van tot op heden uitgevoerd in vitro voorwerk hebben geselecteerd. Omdat we gezien hebben dat JAK- en TAK1-remming in vitro additief effect kunnen hebben, willen we in vivo ook combinaties van remmers testen. We hebben dit alles nu uitgelegd in §3.4.1, waar we steeds naar verwijzen bij de berekeningen van de aantallen dieren. Op deze wijze komen we bovendien tot een lagere schatting van het aantal benodigde muizen.

-B: Wanneer blijkt dat het C57Bl/6 model niet voldoet, dan willen de onderzoekers (een) andere muizenstam(men) gebruiken. De commissie adviseert daarom de naam van de muizenstam in de tabel onderaan dit onderdeel achterwege te laten.

Antwoord: De DEC merkt terecht op dat wij een definitieve keuze voor een muizenstam nog niet kunnen maken. De naam van de muizenstam in de tabel is nu voor alle drie de DAPs weggelaten.

-I: Niet alle bronnen van ongerief zijn vermeld: orale gavages en plaatsing van minipomp ontbreken.

Antwoord: Dit is nu aangevuld.

-J: Muizen overlijden niet soms maar bij hoge uitzondering door narcose. S.v.p aanpassen.

Antwoord: Grofweg 5% van de muizen blijkt helaas te overlijden door narcose. Dat is niet "bij hoge uitzondering" en misschien zelfs meer dan "soms". Met uw welnemen laat ik dit zo staan. Voor de criteria voor het bepalen van humane eindpunten is deze zin niet belangrijk; indien gewenst verwijder ik dit helemaal.

NB: De onderzoekers worden verzocht na te gaan welke opmerkingen over DAP1 ook van toepassing zijn op DAP2 en DAP3.

Antwoord: Veranderingen zijn in alle drie de DAPs doorgevoerd

*DAP3

-A2: De timing van de toediening van de ontstekingsprikkel is niet duidelijk onderbouwd. Waarom wordt de remmer al gegeven (dag 3) voordat er een lichte ontstekingsachtergrond is (dag 4-10)?

Antwoord: Het klopt dat we dit niet uitgelegd hebben. Tijdens in vitro experimenten is het gebruikelijk om een remmer eerder toe te dienen dan de factor die je wilt remmen. Dit hebben we naar in vivo meegenomen, maar dat is bij nader inzien niet zo logisch meer. Voor klinische relevantie zou het beter zijn de remmer toe te voegen als de ontstekingsachtergrond er al is. Bovendien scheelt dit ook nog eens een verdoving voor de dieren als de injectie van de ontstekingsprikkel gedurende de narcose voor het inbrengen van de pompjes kan plaatsvinden. We hebben de timing om deze redenen aangepast.

Niet-technische samenvatting:

-De onderzoekers worden verzocht te checken of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: Wijzigingen in de NTS zijn aangebracht in blauw.

- De antwoorden hebben wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

- Datum vragen: 10-04-2017
- Datum antwoorden: 04-05-2017
- Gestelde vragen en antwoorden:

-Kunnen de go/no go beslissingen wat duidelijker gepresenteerd worden in 3.4?

Antwoord: De go/no go beslissingen staan reeds in de tekst vermeld. Als een remmer niet werkt in DAP2, wordt deze niet ook nog eens in DAP1 of DAP 3 uitgetest. Omdat we in vitro additieve effecten van TAK1 remming en JAK remming hebben gezien willen we ze in vivo ook in combinatie testen, maar dat alléén wanneer beide afzonderlijk een gunstig effect laten zien; is dat niet het geval dan vervallen dus de experimenten waarin remmers van TAK1 en JAKs worden gecombineerd. Voor extra duidelijkheid heb ik dit nu expliciet vermeld in onderdeel 3.4.3.

-De beantwoording van de vraag over bijlage 1, onderdeel B over de groepsgrootte is niet doorgevoerd in DAP2 en DAP3. Het naar beneden bijstellen van de groepsgroottes indien blijkt dat een significant resultaat behaald kan worden met kleinere groepen wordt hierin niet vermeld.

Antwoord: Naar aanleiding van het uw advies in uw derde opmerking (zie beneden), heb ik per DAP nu alle onderdelen besproken, onder andere in de verantwoording van de groepsgroottes. Dit zorgt ervoor dat alle drie DAPs nu op zichzelf staan, en relevante zaken dus ook telkens opnieuw zijn vermeld.

-In DAP2 en DAP3 wordt verwezen naar procedures die in DAP1 zijn beschreven (aanbrengen van kraakbeenschade), maar dit is ongewenst. Graag alle procedures opnemen in DAP2 en DAP3 en de aantallen dieren en inschatting van het totale ongerief voor de dieren hierop baseren. De verwarrende verwijzingen in het projectvoorstel (DAP1+DAP2 wanneer het DMM-model met kraakbeenschade wordt bedoeld) kunnen dan ook vervangen worden door een verwijzing naar alleen DAP2 of DAP3.

Antwoord: Ik ben het met u eens dat het helderder is als elke DAP afzonderlijk een compleet verhaal is. Even wennen voor mij, want ik bouwde mijn verhaal uit vanuit DAP1. Ik heb uw advies gevolgd en in elke DAP nu alle componenten besproken en meegewogen in alle onderdelen.

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project'. De verschillende subdoelen zijn noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk om de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief

individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.

2. Voor zover de DEC weet is er geen “tegenstrijdige” wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is te onderzoeken welke signaalroutes het kraakbeenherstel door stamcellen negatief beïnvloeden, en te onderzoeken of het remmen van deze routes kraakbeenherstel kan bevorderen in muismodellen voor kraakbeenschade. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van een therapie om kraakbeenschade door ongevallen en sportblessures of door osteoartrose bij mensen, paarden of honden te herstellen. Er is een veelheid aan stoffen die het herstel van gewrichtskraakbeen zouden kunnen belemmeren. Deze maken gebruik van een kleiner aantal intracellulaire signaalroutes. De aanvragers zullen het remmend effect van meerdere signaalroutes op kraakbeenherstel testen in muismodellen die de humane situaties zo goed mogelijk nabootsen. Deze kennis kan bijdragen aan de ontwikkeling van een behandeling met stamcellen die tot herstel van het kraakbeen leidt. Het is aannemelijk dat bij mensen, paarden en honden dezelfde signaalroutes betrokken zijn bij belemmering van kraakbeenherstel door stamcellen. Om te komen tot een effectieve therapie voor de doelgroep is nog meer vervolgonderzoek nodig. De DEC is daarom van mening dat er binnen dit project geen directe relatie is tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt dat de kennis van stoffen en hun signaalroutes die kraakbeenherstel belemmeren nog zeer beperkt is, dat deze kennis nodig is voor de ontwikkeling van nieuwe behandelingen om beschadigd kraakbeen te herstellen, en dat er behoefte is aan deze behandelingen. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.
5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.
Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.
Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).
Voor patiënten en de samenleving is dit onderzoek indirect en op de lange termijn van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven.

Gerichte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een betere diagnostiek en behandeling met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt gezonder wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor invaliderende kraakbeenschade, die kan optreden na een ongeval of sportblessure of bij artrose, is van groot belang voor de samenleving.

6. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

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

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

De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is: "Om pijn tijdens de operaties te voorkomen zal pijnbestrijding worden toegepast, naast volledige anesthesie. Er zal geen pijnbestrijding plaatsvinden tijdens kraakbeen repair in een licht ontstoken gewricht. Dit kan namelijk effect hebben op het kraakbeen herstel, zowel rechtstreeks als door beïnvloeden van stoffen in het geactiveerde gewricht die wij juist bestuderen." De DEC is het eens met deze onderbouwing.

10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door de operatie waarin kraakbeenschade wordt aangebracht en de gevolgen daarvan. De combinatie van alle handelingen leidt tot matig ongerief voor alle dieren.

12. De integriteit van dieren wordt aangetast doordat hun kniegewricht wordt beschadigd. Het dier wordt hierdoor gedurende enkele dagen gehinderd in zijn normale gedrag en zijn zelfredzaamheid neemt af.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van eerdere ervaringen met deze diermodellen ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De onderdelen van het project die in vitro bestudeerd kunnen worden zijn al uitgevoerd. Voor het beantwoorden van de resterende onderzoeksvragen zijn dierproeven noodzakelijk, aangezien kraakbeen anders reageert zodra het uit zijn natuurlijke omgeving gehaald wordt. De aanvrager wil ook het kraakbeenherstel bij artrose en bij ontsteking onderzoeken. Hierbij zijn alle weefsels in het gewricht en het immuunsysteem betrokken, waardoor dit niet goed onderzocht kan worden zonder proefdieren.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. De muis is de minst complexe diersoort met kraakbeen en een immuunsysteem die voldoende overeenkomen met de humane situatie. Tijdens de knieoperaties wordt adequate pijnstilling gegeven. Post-operatieve pijnstilling wordt niet gegeven omdat dit kan interfereren met de resultaten van de proef. Normaliter wordt na een dergelijke operatie de geopereerde achterpoot de eerste twee dagen nog wat ontzien, en is er daarna weer een normaal looppatroon (waaruit wordt afgeleid dat het dier geen pijn meer heeft). Een deel van de dieren krijgt artrose in het kniegewricht, maar het experiment wordt al beëindigd voordat dit pijn oplevert. Bij een ander deel van de dieren wordt een lichte ontsteking in het kniegewricht aangebracht. Ook de hiermee gepaard gaande pijn kan niet bestreden worden omdat dit kan interfereren met de resultaten van de proef. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van mannelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: Uit eerder onderzoek blijkt dat het kraakbeen van mannetjes beter herstelt dan het kraakbeen van vrouwtjes. In het algemeen is een groot effect (in dit geval kraakbeenherstel) makkelijker en met minder dieren vast te stellen. De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de

doelstellingen met zo min mogelijk dieren te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren.

19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een matige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken. Voor patiënten en de samenleving is dit onderzoek van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Osteoartrose is een veelvoorkomende ziekte van de gewrichten die gepaard gaat met pijn en een beperking van de mobiliteit. Er is op dit moment geen genezende therapie bekend, waardoor patiënten zijn aangewezen op vervanging van het gewricht door een kunstgewricht via een operatie. Dit is niet altijd mogelijk voor alle aangedane gewrichten en kent ook nadelen. Wanneer het mogelijk wordt om beginnende kraakbeenschade te herstellen met stamcellen van de patiënt, dan leidt dit tot veel gezondheidswinst. De commissie acht het ontwikkelen van een genezende therapie voor osteoartrose van substantieel belang.
3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: onderzoeken welke signaalroutes het kraakbeenherstel door stamcellen negatief beïnvloeden, en of het remmen van deze routes kraakbeenherstel kan bevorderen in muismodellen voor kraakbeenschade. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van een therapie om kraakbeenschade door ongevallen en sportblessures of door osteoartrose bij mensen, paarden of honden te herstellen. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten en de samenleving voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De dieren zullen mogelijk pijn ondervinden van de aangebrachte kraakbeenschade in één van beide kniegewrichten. Het bestrijden van deze pijn is niet mogelijk omdat dit het herstel van kraakbeen

met stamcellen kan beïnvloeden. De pijn is niet zo ernstig dat de dieren een afwijkend looppatroon ontwikkelen.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
- Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
- De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
- De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus .

3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101, [REDACTED]
6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020171924

Bijlagen

2

Datum 2 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 30 mei 2017. Het gaat om uw project "Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1030020171924. 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:

2 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020171924

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
2 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171924

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101, [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
2 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171924

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Naam: [REDACTED]
Functie: Instantievoor Dierenwelzijn
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 juli 2017
Geplande einddatum: 30 juni 2022
Titel project: Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren
Titel niet-technische samenvatting: Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
E-mailadres DEC: [REDACTED]


Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam: 
Functie: Instantie voor dierenwelzijn
Plaats: Nijmegen
Datum: 30 mei 2017

Datum:
2 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171924



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Geert Grooteplein 29

Postbus 9101, [REDACTED]

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020171924

Bijlagen

2

Datum 2 juni 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 2 juni 2017

Vervaldatum: 2 juli 2017

Factuurnummer: 171924

Ordernummer: Kostenplaats en kostensoort: 040823-461220 [REDACTED]

projectnummer: 2016-0086 Verantwoordelijk onderzoeker: [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1030020171924	€ 1.541,00

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

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

Verzonden: vrijdag 23 juni 2017 11:55

Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: AVD1030020171924: Aanhouden beoordelen

Geachte Instantie voor Dierenwelzijn,

Op 30 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren met aanvraagnummer AVD1030020171924. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze e-mail leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

- U geeft aan dat alleen mannelijke dieren gebruikt zullen worden. De onderbouwing hiervoor is echter niet voldoende. In de aanvraag wordt aangegeven dat mannetjes beter kraakbeen herstel hebben. In een van de studies waarnaar gerefereerd wordt, worden mannelijke en vrouwelijke dieren inderdaad vergeleken. De variatie binnen de proefgroepen is in deze studie echter groot en de verschillen tussen mannelijke en vrouwelijke dieren is niet significant. U wordt daarom gevraagd uw keuze voor het gebruik van alleen mannelijke dieren beter te onderbouwen. Hierbij wordt u verzocht aandacht te besteden aan de verwachte toename van het aantal dieren indien zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt worden.

Opsturen informatie

De CCD zou u aanvraag graag in de eerstvolgende vergadering bespreken. Om die reden zouden wij uw reactie graag uiterlijk donderdag 29 juni ontvangen. Mocht dit niet haalbaar zijn, u heeft 14 dagen de tijd om de vragen te beantwoorden. U kunt uw reactie aanleveren via NetFTP en e-mail.

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Namens,

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)

Geachte Centrale Commissie Dierproeven,

Op 23 juni 2017 ontving ik uw verzoek om extra informatie te verschaffen bij mijn aanvraag voor een projectvergunning dierproeven. Het gaat om het project *Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren*, met aanvraagnummer AVD1030020171924.

Uw vraag was: *U geeft aan dat alleen mannelijke dieren gebruikt zullen worden. De onderbouwing hiervoor is echter niet voldoende. In de aanvraag wordt aangegeven dat mannetjes beter kraakbeen herstel hebben. In een van de studies waarnaar gerefereerd wordt, worden mannelijke en vrouwelijke dieren inderdaad vergeleken. De variatie binnen de proefgroepen is in deze studie echter groot en de verschillen tussen mannelijke en vrouwelijke dieren is niet significant. U wordt daarom gevraagd uw keuze voor het gebruik van alleen mannelijke dieren beter te onderbouwen. Hierbij wordt u verzocht aandacht te besteden aan de verwachte toename van het aantal dieren indien zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt worden.*

Onze reactie:

U merkt terecht op dat in de genoemde studie van Fitzgerald et al. geen verschil in kraakbeenregeneratie werd gevonden tussen C57Bl/6 mannen en vrouwen. Spontaan herstel is in deze stam bovendien zeer gering. In feite is dit de enige studie waarin in deze stam kraakbeen repair is vergeleken tussen mannen en vrouwen. De literatuur biedt dus geen rechtstreeks aanknopingspunt voor een keuze voor mannen of vrouwen in onze experimenten.

In de andere genoemde studie, van Eltawil et al. zijn alleen mannetjes C57Bl/6 (en DBA/1), bestudeerd zonder motivering van die keuze. Ook in meer recente in vivo studies aan kraakbeen herstel door stamcellen worden, ook zonder verdere motivering, mannetjes gebruikt. Bijvoorbeeld in de studie van, Leonard, C.A. et al: *Allogeneic bone marrow transplant from MRL/MpJ super-healer mice does not improve articular cartilage repair in the C57Bl/6 strain. PLoS ONE 10:1-14, 2015*, mannetjes werden gebruikt van de C57Bl/6 en MRL/MpJ stammen. In de literatuur wordt dus zonder onderbouwing steeds gekozen voor mannetjes muizen in kraakbeen herstel studies.

Het besluit om op basis van de studie van Fitzgerald et al. te kiezen voor het gebruik van mannetjes muizen berust op figuur 3c in deze studie, waarin getoond wordt dat in de MRL/MpJ muis duidelijk beter kraakbeen herstel wordt gemeten in mannetjes dan in vrouwtjes. De MRL/MpJ muis is een stam die meer spontaan kraakbeen herstel laat zien dan de C57Bl/6. Vandaar dat wij verwachten dat, als het ons lukt om in C57Bl/6 muizen in vivo chondrogenese te stimuleren, dit het beste tot uiting zal komen bij mannetjes. Een extra argument voor het gebruik van mannetjes muizen vond ik in de studie van Matsumoto, T. et al.: *The influence of sex on the chondrogenic potential of muscle-derived stem cells. Arthritis Rheum 58:3809-3819, 2008*. Stamcellen uit mannetjes C57Bl/10 bleken betere in vitro kraakbeenvorming en beter in vivo kraakbeenherstel te laten zien dan die uit vrouwtjes. Hierbij moet ik benadrukken dat ook dit een indirecte aanwijzing is omdat de oorsprong van de stamcellen (spier) in deze studie anders is dan in onze beoogde experimenten, waarin stamcellen uit subchondraal bot het defect moeten repareren. Bovendien is de C57Bl/10 muis gebruikt en niet de C57Bl/6. Na uitgebreid literatuuronderzoek is dit de beste wetenschappelijke onderbouwing voor de keuze voor mannetjes in onze beoogde experimenten. Mijn conclusie op basis van de literatuur is: als er al sexe-afhankelijke verschillen in kraakbeen repair worden gevonden, dan blijken mannetjes muizen of stamcellen uit mannetjes muizen dit beter te kunnen dan de vrouwtjes.

Daarnaast wil ik ingaan op uw verzoek om te proberen aan te geven wat de verwachte toename van het aantal benodigde dieren zou zijn indien zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt zouden worden.

In het artikel van Fitzgerald is in figuur 3C bij de C57Bl/6 stam de effect grootte en de spreiding vergelijkbaar bij mannetjes en vrouwtjes, dus zou het gebruik van beide geslachten grofweg een dubbeling van het aantal te gebruiken proefdieren betekenen.

In de MRL-stam, zou het benodigde aantal vrouwtjes door de lagere effect grootte, op basis van Figuur 3C van de Fitzgerald-paper, 2x zo hoog zijn als dat van mannetjes om tot dezelfde power te komen.

Samenvattend: de dieraantallen kunnen bij het meenemen van beide geslachten niet alleen verdubbelen, maar afhankelijk van de stam zelfs verdrievoudigen.

Wij zullen dus ook in het kader van vermindering van aantallen proefdieren bij voorkeur alleen mannetjes gebruiken.

Ik hoop hiermee uw vragen naar tevredenheid beantwoord te hebben

Met vriendelijke groet,

██████████



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Postbus 9101, [REDACTED]

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020171924

Bijlagen

1

Datum 5 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 30 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren" met aanvraagnummer AVD1030020171924. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 29 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof de onderbouwing voor het gebruik van mannelijke dieren.

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 "Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren" starten. De vergunning wordt afgegeven van 5 juli 2017 tot en met 30 juni 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 30 mei 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 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171924

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).


Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101, [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 5 juli 2017 tot en met 30 juni 2022, voor het project "Onderzoek naar factoren die kraakbeenherstel door stamcellen belemmeren" met aanvraagnummer AVD1030020171924, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is wetenschappelijk onderzoeker. Voor de uitvoering van het project is Instantievoor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 30 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 30 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 30 mei 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 30 mei 2017, ontvangen op 30 mei 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 29 juni 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Bevorderen van kraakbeenherstel mbv kinase remmers				
	Muizen (Mus musculus) /	336	100% Matig	
3.4.4.2. Bevorderen van kraakbeenherstel mbv kinase remmers in een osteoartrotisch gewricht				
	Muizen (Mus musculus) /	420	100% Matig	
3.4.4.3. Bevordering van kraakbeenherstel mbv kinase remmers in een ontstoken gewricht				
	Muizen (Mus musculus) /	336	100% Matig	

Aanvraagnummer:

AVD1030020171924

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:
AVD1030020171924

Weergave wet- en regelgeving

Dit project en wijzigingen

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

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

Verzorging

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

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

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

Pijnbestrijding en verdooving

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

Aanvraagnummer:
AVD1030020171924

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Inventaris Wob-verzoek W17-12									
nr.	documenten NTS20171926	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	DEC-advies				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
9	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
10	Overzicht			x					
11	Advies CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x	x	



06 JUNI 2017

Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Universiteit Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	30275924
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
		Postbus	12007
		Postcode en plaats	3501AA Utrecht
		IBAN	NL27INGB0000425267
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Docent
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

(Titel) Naam en voorletters

Dhr. Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag

Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3

Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?

Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier

Nee > Ga verder met vraag 3

- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?

Nee > Ga verder met vraag 3

Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?

Startdatum 1 - 8 - 2017

Einddatum 31 - 7 - 2022

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Onderwijs met kleine proefdieren

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

Onderwijs met kleine proefdieren

- 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 ondertekende verklaart:

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

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

[Redacted Name and Function]

Utrecht
 30-05

[Redacted Signature]



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.

Proefdierkunde, diergedrag- en welzijn zijn belangrijke onderwijsonderwerpen binnen het curriculaire en

extra-curriculaire onderwijs bij Diergeneeskunde, diverse (master en PhD) opleidingen en functie-specifieke bij- en nascholing in het kader van de WOD. Vanuit onze afdeling worden dierproeven gedaan in de vorm van practica en trainingen die onderdeel uitmaken van deze verschillende opleidingen, dit betreft art. 9 personen en universitaire studenten. Onderwijs rondom deze onderwerpen wordt als zelfstandige cursus of als verplicht onderdeel van een cursus verzorgd. Daarnaast is het regelmatig nodig bevoegde medewerkers van onze afdeling (onderzoekers, biotechnici en stagiaires) te trainen in nieuwe technieken voor het verkrijgen van bekwaamheid hierin (in het kader van bij en nascholing). Dit project beoogt hierin te voorzien.

Binnen deze onderwijsactiviteiten vallen een aantal practica en trainingen met veel gebruikte kleine knaagdieren (muis, rat, hamster, cavia) en konijnen die deels wel en deels niet als dierproef worden aangemerkt (omdat zij vanwege het niveau van ongerief niet als dierproef beschouwd worden, dit is het geval voor alle practica met hamster, cavia en konijn. Deze worden in het vervolg van deze aanvraag om deze reden niet meer genoemd). Deze practica en trainingen zijn nodig om een aantal redenen, per punt hieronder wordt hierbij het leerdoel en de doelgroep vermeld:

- 1) Voor het behalen van de bevoegdheid om dierproeven met de veelgebruikte kleine knaagdieren te mogen plannen en uitvoeren (artikel 9 Wet op de Dierproeven). Daarvoor is soortspecifieke kennis nodig, een kandidaat moet onder andere kennis hebben opgedaan over: *"soortspecifiek diergedrag", "soortspecifieke verantwoorde wijze van omgang met en hanteren van proefdieren, (alsmede enige praktische handvaardigheid hiermee heeft opgedaan)", "de verschillende wijzen van afnemen van lichaamsvloeistoffen en van een aantal andere veel gebruikte experimentele technieken bij de te gebruiken soort (o.a. injectietechnieken, orale toediening en catheterisatie), alsmede enige praktische handvaardigheid hiermee heeft opgedaan", "herkenning van soortspecifieke symptomen van angst, pijn en lijden en het toepassen van humane eindpunten"* (Bijlage 6 bij art. 5, Dierproevenregeling 2014).

Wij bieden vanuit onze afdeling onderwijs inclusief practica met muizen en ratten aan om deze art. 9 bevoegdheid te behalen, dit in de vorm van:

- een Nederlandstalige of Engelstalige proefdierkunde cursus. Wij bieden een basiscursus die gecombineerd kan worden met de soortspecifieke module knaagdieren en konijn. Dit betreft met name universitaire masterstudenten en (toekomstig) dieronderzoekers. Cursisten moeten in hun vooropleiding minimaal 500 SBU (studiebelastingsuren) of 18,75 ECTS Biologische basisvakken (anatomie/fysiologie etc.) gevolgd hebben. Indien zij niet aan deze eis voldoen moeten zij hiervoor een aanvullend tentamen doen voorafgaand aan de cursus. Enkele cursisten volgen alleen de basiscursus om elders een soortspecifieke module van een andere diersoort te volgen.
- de opleiding diergeneeskunde. Binnen de hele opleiding zijn alle benodigde theorie en praktijk verweven om de artikel 9 bevoegdheid te halen (zoals in de Proefdierkundecursus, zie punt hierboven).

In de hierbij behorende practica leren cursisten hanteren van ratten en muizen en leren zij over de theorie en praktijk van veel gebruikte basistechnieken bij deze dieren.

- 2) Voor het verkrijgen van bekwaamheid in specifieke biotechnische handelingen (Dierproeven besluit 2014, artikel 8 lid 2). Om bekwaamheid te verkrijgen is het niet voldoende een enkele keer een practicum te doen. Extra oefening met levende dieren is dan noodzakelijk, al zal waar mogelijk wel eerst worden geoefend op dierproefvrije modellen en op dode dieren (in het geval van complexe handelingen). Doel van trainingen is dan ook expertise ontwikkelen in het uitvoeren van de betreffende handeling(en). Bekwaamheidstrainingen van verschillende biotechnische handelingen zullen in de regel alleen gedaan worden als de betreffende persoon ook daadwerkelijk deze handelingen uit zal gaan voeren in een dierexperiment, dit betreft daarom met name stafleden (afgestudeerde biotechnici, onderzoekers met art. 9) en stagiaires (HBO en WO studenten) van onze eigen afdeling. Op aanvraag van dieronderzoekers van buiten onze afdeling kan onze expertise van bepaalde biotechnische handelingen ook worden ingezet ten behoeve van van trainingen in het kader van bij- en nascholing

- 3) Onze afdeling heeft als missie om een bijdrage te leveren aan het verbeteren van dierenwelzijn. Dit is daarom een belangrijk thema in ons onderzoek en onderwijs. Doelen van diverse onderwijsonderdelen die wij in het universitaire onderwijs verzorgen zijn dan ook te vatten binnen dit thema. Specifiek voor de aangevraagde dierproeven binnen deze aanvraag gaat het om universitair master onderwijs (keuzecursus toegankelijk voor diergeneeskunde en andere biomedische masterstudenten, met als eis dat ze een (bio) medische bachelor hebben afgerond en al basiskennis van gedrag hebben) waarin het doel is inzicht te verkrijgen in diergedrag, dierenwelzijn en de neurobiologie van gedrag. Voor (toekomstig) onderzoekers en dierenartsen is het van belang kennis te ontwikkelen over normaal gedrag van dieren en hoe gedrag wordt aangestuurd, gedrag is namelijk DE parameter bij uitstek als het gaat over dierenwelzijn. Gedragspractica dragen bij aan dit doel. Als er binnen deze practica de natuurlijke behoefte van het dier (meer dan in de normale ruis van de verzorging) wordt beperkt of als het gedrag wordt beïnvloedt met behulp van farmaca (om de neurobiologie van gedrag te onderzoeken) dan worden deze practica beschouwd als een dierproef in de zin der wet.

In de voorliggende projectaanvraag willen wij de invasieve practicum en training onderdelen aanvragen. Hiermee willen wij, na een uitgebreid traject van alternatieve middelen, de studenten en medewerkers de noodzakelijke onderdelen aanbieden, die enkel met invasieve handelingen op dieren kunnen worden aangeleerd.

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?

Doel

Een belangrijk algemeen doel van het onderwijs van onze afdeling is om een bijdrage te leveren aan het verbeteren van dierenwelzijn. Dit gebeurt in het kader van de opleidingen van studenten en medewerkers die professioneel met dieren gaan werken, met name in het onderzoek (als het gaat om art. 9 personen, life science studenten en biotechnici) maar ook in het diergeneeskundig veld (als het gaat om diergeneeskunde studenten). In deze contexten hechten wij er veel belang aan om cursisten zich meer bewust te maken van het belang van dierenwelzijn en intrinsieke waarde van dieren. Specifiek voor de proefdierkunde cursus zoals eerder benoemd onder 3.1 beogen wij het verantwoord en zorgvuldig gebruik van muizen en ratten in dierproeven. Dit alles noemen wij met een algemene term "bouwen aan attitude ten op zichte van dieren". Alle practica en trainingen met dieren leveren een belangrijke bijdrage aan dit doel.

Verder komen in het kader van proefdierkunde, diergedrag- en welzijn onderstaande doelen aan bod in verschillende practica en trainingen

- 1) A) Kennis maken en oefenen met : fixeren*, injectietechnieken, orale gavage en andere toe- en afnametechnieken bij muis en rat.

*Ter informatie: vanwege het intensieve oefenen met fixeren door onervaren personen schatten wij in dat dit voor deze diersoorten meer ongerief met zich meebrengt dan "het inbrengen van een naald volgens goed diergeneeskundig vakmanschap"

B) Training voor het deskundig uitvoeren (verkrijgen van bekwaamheid) van bovenstaande en andere gespecialiseerde technische handelingen die veel gebruikt worden in het onderzoek van onze afdeling. Hieronder valt het doden van dieren, operatietechnieken onder terminale anesthesie (na eerst oefenen op dode dieren).

Beide (A) en (B) als hierboven beschreven hebben als gezamenlijk doel om te bereiken dat

medewerkers goed getraind zijn om op succesvolle wijze dierproeven uit te voeren. Hierbij worden in combinatie met theoretisch onderwijs altijd de 3V's in acht genomen waarbij zij ook leren pijn, stress en ongerief te herkennen en humane eindpunten te formuleren zodat zij dit kunnen toepassen in dierproeven die zij (later) zelf uitvoeren.

- 2) Kennis en inzicht verschaffen met betrekking tot normaal diergedrag, de relatie met dierenwelzijn en de neurobiologische mechanismen die hieraan ten grondslag liggen. Een practicum aangaande de neurobiologische mechanismen van gedrag valt binnen deze aanvraag, hierbij wordt in een kleine experimentele opzet een farmacologisch gedragsproefje gedaan door de cursisten; deelnemers zijn masterstudenten (diergeneeskunde of biologie/biomedici) met al basiskennis van gedrag .

Belang en doel voor (diergeneeskunde) studenten: Door te leren over het gedrag van dieren en hoe dit neurobiologisch wordt gereguleerd kunnen de cursisten gezond en afwijkend gedrag vanuit een neurobiologisch perspectief beter begrijpen om deze kennis toe te kunnen passen in de praktijk. Tevens wordt gewerkt aan academische en attitude vorming door de studenten zelf te laten nadenken over het opzetten van een dierexperiment en alle factoren (zoals standaardisatie, randomisatie, effecten van behandelingen op het dier etc.) die daarbij komen kijken.

Haalbaarheid

Uit onze ervaringen en eigen onderzoek naar attitudevorming blijkt dat cursisten en studenten zich pas echt bewust worden van de effecten (en hun verantwoordelijkheden) van handelingen op levende dieren als ze deze ook zelf op dieren uitvoeren. Het is hierbij een vereiste dat dat in een setting (practicum of training) wordt gedaan waar ook de ruimte en de aandacht is voor de discussie en reflectie op de interactie met deze dieren. Het doel is uit onze ervaring dus zeker haalbaar met de practica in ons onderwijs. Wij hebben een pool van docenten (zoals biotechnisch analisten en onderzoekers) welke allen zeer ervaren zijn in de omgang met en gedoeerde handelingen aan muizen en ratten. Deze personen zullen dan ook een voorbeeldfunctie vervullen en juist het gesprek en de discussie aangaan als het gaat om de juiste omgang met de dieren.

De missie van ons departement is om welzijn van dieren te verbeteren en daarbij zijn we constant bezig om te zoeken naar methoden die dierproeven kunnen verfijnen, verminderen of vervangen. Nieuwe ontwikkelingen integreren wij in ons onderwijs en geven dit zo dus mee aan de personen die met de dieren gaan werken.

3.3 Belang

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

Wetenschappelijk belang:

De practica en trainingen dragen bij aan het vormen van de juiste attitude als het gaat om zorgvuldig en verantwoord uitvoeren van dierproeven. In ons theoretisch én praktisch onderwijs wordt de nadruk gelegd op de 3 V's om dit te bereiken. Bijvoorbeeld worden kandidaten in de practica geïnstrueerd over standaardisatie, het belang van goede omgang met de dieren en hoe technieken (zoals injecties) op een accurate manier uitgevoerd kunnen worden. Hierbij geldt hoe minder het welzijn wordt aangetast bij de dieren (door bijvoorbeeld stress en pijn) en hoe accurater de technieken, hoe minder variatie in (toekomstige) resultaten van dieronderzoekers te verwachten zijn. Dit zal ook de kwaliteit van onderzoeksresultaten ten goede komen.

Maatschappelijk belang:

De wet op de dierproeven bepaalt dat dierproeven alleen gedaan mogen worden **wanneer het resultaat niet zonder inzet van dieren behaald kan worden** en dan alleen als het belang opweegt tegen het ongerief van de dieren. Zolang er nog steeds dierproeven nodig zijn is het van belang dat het welzijn van de proefdieren goed wordt bewaakt en het ongerief zo veel mogelijk wordt beperkt. Voor dit doel is

goede educatie en training van de betrokken personen van essentieel belang. De practica [beschreven in dit project](#) dragen bij aan dit belang door inzicht te verschaffen in het normale gedrag van de dieren (zodat [men](#) kan herkennen als het niet goed gaat met een dier) en door methodes te demonstreren en te oefenen waarbij rekening gehouden wordt met het welzijn van de dieren.

Bevoegde en bekwame dierenartsen en dierenonderzoekers

- Alle dieronderzoekers moeten bekwaam en bevoegd zijn om een dierexperiment op te [mogen](#) zetten en uit te voeren, daarbij is kennis en inzicht in de dieren noodzakelijk
- alle afgestudeerde dierenartsen worden algemeen bevoegd en moeten ook weten hoe om te gaan met kleine knaagdieren en leren over het gedrag van deze diersoorten, zij kunnen die diersoorten immers later in de klinische praktijk ook tegenkomen.

3.4 Onderzoeksstrategie

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

De algemene opzet/strategie binnen verschillende (extra)curriculaire onderwijsonderdelen is steeds hetzelfde van aard.

Kandidaten (diergeneeskundestudenten, proefdierkunde cursisten, stafleden/stagiaires etc.) krijgen eerst theoretisch onderwijs en instructie voordat zij met levende dieren gaan werken. Dit kan zijn aan de hand van een powerpoint, een live demonstratie door de docent en/of zelfstudie aan de hand van videomateriaal. Ook zijn er als het gaat om fixatiemethoden en biotechnische handelingen verschillende dierproefvrije modellen aanwezig in de practicumzaal die aan bod komen tijdens het onderwijs.

Practica, trainingen en demonstraties van afname technieken, injectietechnieken en orale gavage worden altijd vooraf gegaan door een practicum of training in hanteren respectievelijk fixatietechnieken van de betreffende diersoort. Bij al deze onderdelen wordt er een op een of in kleine groepjes gewerkt zodat de docent tijdens de handelingen feedback kan geven en het welzijn van de dieren goed in de gaten kan houden. Er worden ook volledig vervangende modellen ingezet. Zo hebben we een model rat waarmee het aanprikken van de staartvene kan worden geoefend en kunnen kandidaten oefenen met hechten op een fietsband. Op korte termijn zullen wij ook geplastineerde dieren tot onze beschikking hebben om anatomie te demonstreren en om de relatie met bijvoorbeeld verschillende bloedafname technieken te kunnen laten zien.

Als het specifiek gaat over vaardigheidstraining om bekwaamheid te krijgen voor stafleden en stagiaires wordt eenzelfde strategie gevolgd. Als het gaat om aanleren van operatietechnieken wordt eerst theorie geboden/een demonstratie gegeven, dan volgt het oefenen op dode dieren en dan pas op dieren onder terminale anesthesie.

Ook als dieren worden ingezet voor gedragspractica wordt er gebruik gemaakt van zelfstudie en videomateriaal zodat kandidaten goed voorbereid zijn. Specifiek bij practica waarin studenten een neurofarmacologisch gedragsexperiment uitvoeren worden studenten gedwongen na te denken over een goede experimentele opzet (zoals randomisatie, standaardisatie, power berekening) voordat zij groepen dieren gaan behandelen met een psychofarmacon om het effect op gedrag te onderzoeken.

Omdat wij continu bezig zijn met het verbeteren van ons onderwijs zullen wij de gebruikte technieken regelmatig evalueren en waar nodig aanpassingen doen aan de hand van pilots om de practica te laten aansluiten op de meest recente wetenschappelijke ontwikkelingen. Ook is het 3V centrum ULS een onderdeel van onze afdeling, hierdoor zijn wij direct op de hoogte wanneer elementen van onderzoek en ook onderwijs vervangen kunnen worden door alternatieven.

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

De volgende typen practica kunnen worden onderscheiden:

- 1) Trainingen en practica [biotechnieken](#) – hier gaat het specifiek om practica/demonstraties/trainingen fixatietechnieken, injectietechnieken, orale gavage, afnametechnieken, operatietechnieken onder terminale anesthesie en dodingsmethoden

2) Practica diergedrag- en welzijn – hier gaat het om beïnvloeding van gedrag met neurofarmaca

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

De logische samenhang van alle onderdelen heeft drie kanten.

1. De practica en trainingen van technieken dragen allemaal bij aan het trainen van vaardigheden (bekwaamheid) en attitude, en zoals onder 3.4.1 is beschreven **wordt** altijd een getrapte strategie gevolgd: theorie, alternatief zonder dierproef, dierproef.

2. Training van technieken en vaardigheden is één essentieel onderdeel van het verantwoordelijk werken met (**proef**)dieren. Omdat het om levende dieren gaat en zij een intrinsieke waarde hebben, is het voor het bouwen aan attitude juist belangrijk meer te laten zien van de dieren. Daarbij is kennis en begrip van diergedrag een heel belangrijk element **voor (toekomstig) onderzoekers en dierenartsen**. Diergedrag en welzijn wordt bepaald door neurobiologische mechanismen, die wij de studenten willen bijbrengen. Onderwijs waarin wij illustreren hoe neurobiologische systemen gedrag beïnvloeden draagt bij aan meer begrip over diergedrag en dierenwelzijn bij studenten.

Belangrijk om te noemen is dat ook bij de practica over diergedrag een getrapte strategie ten grondslag ligt aan het onderwijs. **Allereerst wordt** de theorie **van diergedrag** behandeld (o.a. met gebruik van beeldmateriaal en e-learning), **daarna volgen** dan de gedragspractica waarbij dieren in een gedragstest worden bestudeerd zonder dat dit als een dierproef wordt beschouwd. Deze **stappen** vormen een belangrijke basis voor practica waarin juist het opzetten van een neurofarmacologisch gedragsexperiment aan bod komt om meer inzicht in neurobiologie van gedrag te krijgen. Dit laatste wordt pas bij specifiek curriculaire of extra curriculaire onderwijs ingezet en valt binnen deze **vergunningaanvraag**. Hier bouwen studenten aan wetenschappelijke werkhouding, en leren zij over de samenhang tussen hersenen en gedrag, wat weer van belang is om inzicht te krijgen in gedrag, ontwikkeling en welzijn.

3. Alle onderdelen zoals in deze aanvraag omschreven, maar ook de niet-invasieve practica, worden uitgevoerd op een "pool" van onderwijstdieren, dieren kunnen dus voor meerdere practica worden ingezet. Door al deze dieren op een projectvergunning te gebruiken zijn rusttijden en een optimale inplanning van de dieren geborgd. Als het gaat over terminale anesthesie of dodingsmethoden is het duidelijk dat dat geschied op dieren die voor de overige onderdelen niet meer nodig zijn. Ook zullen hier dieren voor gebruikt kunnen worden die surplus zijn uit fok of ander onderzoek.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Trainingen en practica biotechnieken
2	Practica diergedrag- en welzijn
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	10800	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	Universiteit Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Trainingen en practica biotechnieken

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het doel van de practica en trainingen [beschreven in deze bijlage](#) is:

- 1) kennismaken en oefenen met fixeren en enkele toedienings- en afnametechnieken bij muis en rat. Dit betreft de practica in het kader van de proefdierkundecursus, die vereist is voor het behalen van de art. 9 bevoegdheid om dierproeven te mogen plannen en uitvoeren. Deze practica worden gegeven in de Nederlandstalige en Engelstalige proefdierkunde cursussen (basiscursus met soortspecifieke module knaagdier en konijn) en in het diergeneeskundig curriculum, dus betreft (toekomstig) biologisch/biomedisch onderzoekers en dierenartsen.
- 2) In het kader van opleiding tot professional en bij –en nascholing kunnen tevens dezelfde en andere basistechnieken geoefend worden, dit kan in meerdere sessies gedaan worden (afhankelijk van het startniveau van de kandidaat) onder 1-op-1 begeleiding van een expert. In (bekwaamheids)trainingen kunnen daarnaast chirurgische technieken op dode dieren of onder terminale anesthesie en/of dodingsmethoden bij ratten en muizen aan bod komen [mits de kandidaten \(afgestudeerde biomedici, onderzoekers, WO/HBO studenten\) van deze training deze methoden ook in hun eigen experimenten zullen gaan uitvoeren. Als het studenten/stagiaires betreft wordt dit in hun experimenten uiteraard ook altijd onder begeleiding van een bevoegde en bekwame professional gedaan.](#)

Kandidaten, [zoals hierboven beschreven bij \(1\) en \(2\)](#), krijgen altijd eerst theoretisch onderwijs en/of mondelinge instructie en demonstratie voordat zij met levende dieren gaan werken. Dit is afhankelijk van het betreffende practicum of de betreffende training. Dit kan bijvoorbeeld zijn aan de hand van een powerpoint, een live demonstratie door de docent en/of zelfstudie aan de hand van videomateriaal. Onervaren personen worden tijdens het praktische onderwijs intensief begeleid door ervaren docenten, [bij toedienings-en afnamemethoden en meer invasieve technieken wordt dit altijd 1-op-1 begeleid, bij het](#)

oefenen met fixeren houdt een docent toezicht op een aantal (maar maximaal 5) studenten. Bij practica en trainingen wordt maximaal één handeling op hetzelfde dier uitgevoerd, m.u.v. practica hanteren en fixeren. Bij trainingen van chirurgische technieken wordt na instructie en theorie ook altijd eerst geoefend op dode dieren voor men overgaat op het opereren van een dier onder terminale anesthesie.

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

De practica en trainingen bevatten verschillende technieken, Afhankelijk van het doel van het onderwijs onderdeel kan de aard en de frequentie van de handelingen op levende dieren verschillen. Wij maken daarom een onderscheid tussen (1) practica in het kader van de proefdierkundecursus (behalen van wettelijke art. 9 bevoegdheid in de extracurriculaire proefdierkunde cursus en in het curriculum van diergeneeskunde) en (2) bekwaamheidstrainingen voor stafleden en stagiaires. In het eerste geval is het alleen kennismaken met de technieken en bouwen aan attitude, en is een enkel practicum per onderdeel per cursist voldoende. Voor bekwaamheidstraining is meer oefening nodig omdat de kandidaat in staat moet zijn om aan het eind van de training de techniek zelf te beheersen.

- 1) Bij practica in het kader van de bevoegdheid komen naast dierproefvrije technieken de volgende handelingen bij rat en muis aan bod: fixatietechnieken, toedieningstechnieken (subcutane en intraperitoneale injectie bij muis en orale gavage bij rat). De extracurriculaire proefdierkunde cursus wordt zo'n 10-12 keer per jaar gegeven (max 24 cursisten/cursus) en bij diergeneeskunde worden dezelfde practica verzorgd in jaar 1 bachelor (hanteren en fixeren, totaal ongeveer 225 studenten) en jaar 1 master (basistechnieken, max 50 studenten per cursus, 4x per jaar); afhankelijk van het aantal deelnemende cursisten worden meer of minder dieren ingezet in de practica. Het toepassen van toe- en afnametechnieken wordt bijgehouden zodat de totale belasting per dier niet te hoog wordt, bij het oefenen van fixeren wordt regelmatig gewisseld tussen individuele dieren om de belasting per dier laag te houden, bij technieken wordt genoteerd wanneer welke dieren zijn ingezet, waarbij elk dier tijdens het practicum maar 1x wordt ingezet.
- 2) Bij bekwaamheidstrainingen kunnen naast de bij (1) genoemde technieken ook andere toe- en afnametechnieken aan bod komen, dit is afhankelijk van de lopende onderzoekprojecten en de bekwaamheid van de medewerkers en stagiaires die daarbij betrokken zijn en getraind moeten worden. Het verschil met (1) is dat de betreffende kandidaten vaker zullen moeten oefenen om bekwaamheid op te bouwen, afhankelijk van de start kwalificatie van de medewerker of stagiair zal het aantal oefensessies bepaald worden. Ook hier geldt dat het toepassen van toe- en afnametechnieken wordt bijgehouden zodat de totale belasting per dier niet te hoog wordt, bij het oefenen van fixeren wordt regelmatig gewisseld tussen individuele dieren om de belasting per dier laag te houden, bij biotechnieken wordt genoteerd wanneer welke dieren zijn ingezet, waarbij elk dier tijdens de training maar 1x wordt ingezet voor een injectie/bloedafname.

Op basis van onze ervaringen en het lopende onderzoek zullen de volgende niet-chirurgische technieken aan bod kunnen komen:

- Injectietechnieken (veel voorkomend zijn i.p. injectie, s.c. injectie bij rat en muis en orale gavage bij rat)
- bloedafname technieken (veel voorkomend zijn staartsnede, wangprik, vena saphena)
- dodingsmethoden (veel voorkomend zijn decapitatie bij rat en muis, cervicale dislocatie bij muis)
- Andere technieken

Op basis van onze ervaringen en het lopende onderzoek zullen de volgende chirurgische technieken aan bod kunnen komen:

- cannulatie vena jugularis
- stereotactisch opereren
- intra craniale injecties
- perfusie
- andere technieken

Andere techniek is een verzamelnaam voor handelingen of operaties waarvan nu niet bekend is of ze gebruikt gaan worden en of er een noodzaak is deze te trainen. De noodzaak deze te trainen zal altijd met onderbouwing voorgelegd worden aan de IvD.

Omdat wij voor al het onderwijs dezelfde "pool" met dieren gebruiken kunnen wij inzet van dieren in trainingen en practica bijhouden en passende rusttijden in acht nemen. In het geval van chirurgische

technieken zal waar dat kan eerst geoefend worden op dode dieren en daarna op dieren onder terminale anesthesie. Als het gaat over terminale anesthesie of dodingsmethoden is het duidelijk dat dat geschied op dieren die voor de overige onderdelen niet meer nodig zijn. Ook zullen hier dieren voor gebruikt kunnen worden die surplus zijn uit fok of ander onderzoek.

Op basis van het aantal practica dat wij verzorgen worden gemiddeld zo'n 80-90 muizen en 48 ratten per maand ingezet voor technieken en 240 muizen en 48 ratten voor hanteren en fixeren (zie bijlage "overzicht practica per jaar" voor een overzicht, de dieren tellen niet op omdat het om dezelfde pool met dieren gaat). Dit is wel afhankelijk van het aantal cursussen / trainingen en aantal cursisten / trainees.

Bovenstaande technieken, aard en frequentie zullen in meer detail worden afgestemd met de IvD. Met hen wordt ook training van stagiaires en personeel afgestemd, daarbij wordt rekening gehouden met de opleidingsdoelen, noodzaak voor de medewerker om een techniek te leren en het opleidingsniveau.

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

Waar mogelijk maken wij gebruik van surplus dieren in ons onderwijs. We gebruiken de dieren voor meerdere practica en trainingen, over de tijd bepaalt de individuele staat van dieren en hun gedrag of zij nog geschikt zijn voor onderwijs. Daarnaast kan leeftijd van de dieren een bepalende factor zijn (oudere dieren zijn vatbaarder voor ziekten) maar dieren die goed functioneren en geen extra ongerief ondervinden van het onderwijs kunnen bij ons ouder worden dan gebruikelijk in onderzoek.

Het systeem van rusttijden vereist echter dat wij meer dieren op voorraad hebben dan er per practicum nodig zijn, dit met name in drukke onderwijs perioden. Zie bijlage "Overzicht practica per jaar" voor een indicatie hiervan.

B. De dieren

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

Er worden verschillende outbred en inbred ratten en muizen gebruikt in het onderwijs, deze dieren worden ingezet voor alle onderdelen die vallen onder deze projectaanvraag. In de regel gebruiken wij stammen of lijnen die bekend staan om hun rustige karakter en goed kunnen habitueren aan de procedures in ons onderwijs. Zo gebruikten wij afgelopen jaren muizenstammen C3H en BALB/c en Wistar en Brown Norway ratten.

Zo mogelijk worden surplus dieren gebruikt, mits de dieren niet teveel ongerief hebben ondervonden in voorgaande proef.

In de extra bijlage staat een overzicht van het aantal dieren dat wij in theorie in gaan zetten, op basis van het aantal practica dat wij naar verwachting gaan geven.

Wij kunnen daarnaast gebruik maken van cijfers van het aantal dieren wat we in de afgelopen 3 jaar hebben ingezet. In de periode 2014-2016 hebben we tot nu toe in totaal 618 muizen en 244 ratten gebruikt in het onderwijs, dat is omgerekend ongeveer 309 muizen en 122 ratten per jaar. Dit komt ongeveer overeen met de geschatte aantallen op basis van de inzet in practica in de bijlage (berekening komt uit op 360 muizen en 108 ratten). Omdat we meer en meer gebruik maken van surplusdieren (ten opzichte van eerdere jaren) en die wat minder lang meegaan willen we op basis van beide schattingen de ruimste marge nemen.* Dan komen we op 360 muizen en 122 ratten per jaar. Voor een periode van 5 jaar worden dat in totaal **1800 muizen en 610 ratten**. Een deel van de ratten (208) zullen eerst worden ingezet voor het bestuderen van gedrag zoals beschreven in bijlage 2.

Als we dieren bestellen zijn deze jong (6-7 weken oud) zodat ze wat langer mee kunnen draaien in het onderwijs. Als wij surplus dieren overnemen zijn ze in de regel wat ouder. De dieren bereiken bij ons doorgaans een leeftijd van een half jaar tot een jaar.

*Surplusdieren zijn in de regel ouder dan dieren die wij bij de fokker zouden bestellen. Als we dieren afvoeren wordt gekeken naar parameters zoals algemene conditie en gewicht en leeftijd. Leeftijd speelt dan eerder een rol om dieren af te voeren. Ratten worden met de leeftijd lastiger hanteerbaar en dieren gaan sneller gezondheidsproblemen- of gedragsproblemen (zoals begrazen) vertonen.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

De ratten die worden gebruikt voor practica diergedrag en welzijn (bijlage 2) worden hergebruikt voor de in deze bijlage 1 beschreven trainingen en practica.

Verder worden ook zo mogelijk surplus dieren uit ander onderzoek gebruikt, mits de dieren in goede conditie zijn en niet teveel ongerief hebben ervaren in voorgaande proeven. Voor trainingen op dode dieren en dieren onder terminale anesthesie is dat geen vereiste.

De dieren worden over het algemeen in meerdere practica en trainingen ingezet, de individuele staat en gedrag van dieren bepaalt of zij nog geschikt zijn voor onderwijs. Er wordt gekeken naar gedrag tijdens het onderwijs (hanteerbaarheid) en in de thuishooi kunnen gedragingen opvallen zoals begrazen (als dat wondjes veroorzaakt) of agressie. Wondjes door vechten zijn een indicatie. Daarnaast kan leeftijd een bepalende factor zijn (oudere dieren zijn vatbaarder voor ziekten, bijvoorbeeld komen meer tumoren voor) maar dieren die goed functioneren en geen extra ongerief ondervinden van het onderwijs kunnen bij ons ouder worden dan gebruikelijk in onderzoek.

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

In ons onderwijs maken wij al veel gebruik van vervangende methoden waar dat mogelijk is. Zo leren de cursisten hechten op een model met een oude fietsband en een spons, oefenen zij met het aanpakken van de laterale staartvene in de Koken rat en is er als zelfstudie voor studenten videomateriaal beschikbaar waarin de hanteermethoden gedemonstreerd worden. Verder maken we gebruik van demonstraties en foto- en video materiaal om de cursisten te introduceren met bijvoorbeeld diergedrag en verschillende biotechnische handelingen. Er wordt binnen ons onderwijs veel aandacht besteed aan de 3V's, bijvoorbeeld binnen de proefdierkunde cursus zit een college 3V's en een college waar de nadruk ligt op zoekstrategieën naar 3V methoden.

In de nabije toekomst zijn we van plan plastinaat modellen van rat en muis in te zetten om technieken en anatomie te demonstreren in practica.

Vermindering

Het aantal dieren dat wij gebruiken in onderwijs wordt zoveel mogelijk beperkt, zo gebruiken wij dezelfde dieren voor meerdere practica (de hier beschreven practica en de gedragspractica die onder de drempel van een dierproef vallen). Hier is een afweging gemaakt om een minimaal aantal dieren met in totaal opgeteld meer ongerief te gebruiken (dieren worden voor langere periode gebruikt, maar ongerief van de handelingen is licht), in plaats van meer dieren met minder ongerief.

Verfijning

Het gebruik van instructiefilmpjes op video als zelfstudie en de live demonstraties zorgen ervoor dat de handelingen die gedaan worden, bijvoorbeeld bij het hanteren en fixeren, al bekend zijn en studenten minder lang na hoeven te denken terwijl ze daadwerkelijk met de dieren bezig zijn. Dit is een verfijning voor de dieren die in het practicum worden gebruikt. Tevens hebben wij muis/rat pluche dieren beschikbaar om de handelingen te oefenen voor zij met echte dieren aan de slag gaan.

De thuishooien van de dieren zijn voorzien van meer verrijking dan gebruikelijk in het dierenlaboratorium, muizen krijgen nestmateriaal en twee verschillende shelters, terwijl de ratten tissues en een plastic buis als shelter krijgen. Tevens zijn wij voortdurend bezig om het onderwijs te updaten en te verfijnen, zo hebben we recentelijk de i.p. injectietechniek iets aangepast (op basis van eigen onderzoek) zodat deze wat

makkelijker uit te voeren is voor studenten en de muizen minder lang gefixeerd hoeven te worden.

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

Het onderwijs wordt op kleine schaal uitgevoerd, toedienings- en afnametechnieken vinden plaats tijdens 1-op-1 begeleiding door de docent. Hierdoor wordt het welzijn van de dieren tijdens het uitvoeren van de procedure voortdurend in de gaten gehouden en wordt er tijdig ingegrepen als er iets mis (dreigt) te gaan. Dieren worden na een biotechnische handeling individueel in de gaten gehouden.

Chirurgische technieken worden alleen geoefend op dode dieren of onder terminale anesthesie zodat pijn en lijden wordt voorkomen.

Wanneer een dier naar het oordeel van de docent of dierverzorger tijdens het onderwijs door verkeerd fixeren, verkeerd uitgevoerde biotechnieken of een fout bij een operatie een ernstig trauma wordt aangedaan wordt het dier geëuthanaseerd. Dit komt heel zelden voor.

Er worden geen negatieve milieueffecten verwacht.

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Nvt.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

Ongeriefinschatting/humane eindpunten

H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Kortstondige pijnprikkel bij biotechnieken, zou meer ongerief geven om ook nog pijnstilling toe te dienen.

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

Bij terminale anesthesie wordt het dier buiten bewustzijn geopereerd waarbij een mix wordt gebruikt die ook pijnstillende werking heeft. Omdat het dier niet meer wakker wordt is er geen post-operatieve pijnbestrijding nodig.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

stress door het hanteren en fixeren en door biotechnieken uitgevoerd door niet-ervaren personen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

Intensieve begeleiding door de docent, waardoor op tijd kan worden ingegrepen als er iets mis (dreigt) te gaan. Bij fixeren wordt gewisseld tussen dieren en er wordt maar 1 bak dieren ingezet per student per practicum. Dieren worden goed gemonitord na het toepassen van biotechnieken, door ze even apart te zetten of te markeren. Wanneer er humane eindpunten worden geconstateerd wordt het dier uit de proef gehaald (zie humane eindpunten hieronder)

J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Wanneer een dier naar het oordeel van de docent of dierversorger tijdens het onderwijs door verkeerd fixeren of verkeerde biotechnieken een ernstig trauma wordt aangedaan wordt het dier geëuthanaseerd, omdat het dan buiten het kader licht ongerief valt zoals in dit protocol omschreven. Dit komt heel zelden voor.

Criteria:

- Gedrag indicatief voor ernstige pijn: afwijkende gang, immobiliteit, pilo-erectie, bolle rug/opgetrokken buik en daarmee in combinatie kan de pijnschaal (grimace scale) bij muizen (Langford et al. 2010) en ratten (Sotocinal et al. 2011) gebruikt worden

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

<1%

K. Classificatie van ongerief

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

In deze practica en trainingen worden de afzonderlijke handelingen voor 98% van de dieren niet hoger ingeschat dan "licht" ongerief. Dit gaat dan over stress door het hanteren en fixeren en kortstondige pijn door biotechnieken uitgevoerd door niet-ervaren personen. Mede door de hoeveelheid dieren die we hebben, de habituatie die de dieren laten zien aan het hanteren en de rusttijden die in acht worden genomen wordt het totale ongerief ingeschat op "licht"

Een klein percentage van de dieren wordt alleen voor trainingen ingezet als de dieren onder terminale anesthesie zijn, dit is categorie "terminaal" (dit schatten wij op +/- 2% van het geheel)

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

De dieren worden binnen onze projectaanvraag meermaals ingezet en dood is niet het eindpunt van afzonderlijke practica. Dieren worden na meermaals ingezet te zijn (gedurende half jaar tot een jaar) geëuthanaseerd. Als er een training onder terminale anesthesie wordt gedaan worden de dieren gedood als ze nog buiten bewustzijn zijn. Als de dieren niet hiervoor worden gebruikt bieden wij ze aan voor terminale experimenten, weefsel verzameling of voor het ontwikkelen van plastinaten (die ingezet kunnen worden als vervanging in het onderwijs)

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.	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
		2	Practica diergedrag- en welzijn

Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.

2 Beschrijving dierproeven

A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het doel van practica in deze bijlage is het verkrijgen van inzicht in soortspecifiek diergedrag-, welzijn en neurobiologie van gedrag. Hier zal met name het krijgen van inzicht in neurobiologische regulatie van diergedrag aan bod komen omdat dit de invasieve practica betreft. Door te leren over het gedrag van dieren en hoe dit neurobiologisch wordt gereguleerd kunnen de cursisten gezond en afwijkend gedrag vanuit een neurobiologisch perspectief beter begrijpen om deze kennis toe te kunnen passen in de praktijk. Verder dragen practica binnen deze bijlage bij aan het doel om studenten een wetenschappelijke werk en denkhouding mee te geven. Om deze doelen te bereiken is ervoor gekozen om participanten (het betreft hier diergeneeskunde master studenten maar vaak ook enkele biologie/biomedisch master studenten) in practica aan de hand van een goede onderzoeksvraag en hypothese een gedragsonderzoek op te laten zetten, dit moet uiteraard bijdragen aan het doel van het betreffende vak. Omdat in het huidige onderwijs al een practicum ontwikkeld is bij de master keuzecursus neurobiologie van gedrag (gegeven bij diergeneeskunde) zal in deze bijlage betreffend practicum (neurobiologie van spelgedrag in de rat) als leidraad worden gebruikt. In een periode van 5 jaar kan het zijn dat er aan de hand van evaluaties en ontwikkelingen kleine wijzigingen plaatsvinden. Zo kan het zijn dat er in de toekomst practica worden gegeven met hetzelfde farmacologische principe, maar die een ander gedrag of een ander farmacon betreffen.

Voorkennis/ingangseis: Studenten hebben al basale kennis van diergedrag en wat dit zegt over welzijn aan de hand van dierproefvrije modellen (zoals videomateriaal) en/of hebben al ervaring met het observeren van de dieren in simpele gedragstesten (waarvan het ongerief lager is dan voor een dierproef in aanmerking komt). Alle diergeneeskunde studenten hebben dit in de bachelor gehad.

Kennis over neurobiologie van gedrag kan heel goed verhelderd worden aan de hand van

neurofarmacologische manipulaties. Door gebruik te maken van stoffen die specifiek het beloningssysteem van de hersenen beïnvloeden (agonisten/antagonisten) kan de rol van dat systeem op een bepaald gedrag bestudeerd worden, [dit is dan ook de basis van de in deze bijlage beschreven practica](#).

Opzet practica: aan de hand van theorie over neurobiologische systemen en de relatie met gedrag en welzijn worden studenten eerst begeleid bij het formuleren van een onderzoeksvraag aan de hand waarvan ze een klein farmacologisch gedragsexperiment opzetten (bijvoorbeeld om sociale interactie of spelgedrag te onderzoeken). [In het huidige practicum wordt bijvoorbeeld het effect van methylfenidaat op sociaal spelgedrag bestudeerd. Alle facetten die belangrijk zijn bij het uitvoeren van een goed diergedrag experiment](#), zoals het maken van een ethogram, observatiemethode, standaardisatie, randomisatie, blinderen, statistiek en interpretatie van resultaten komen aan bod. Hierdoor leren [studenten](#) meer over het gehele proces van wetenschappelijk gedragsonderzoek en leren zij wat eventuele consequenties zijn van de keuzes die ze maken in het ontwerp van hun experiment.

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.

Studenten krijgen altijd eerst theoretisch onderwijs en/of mondelinge instructie en demonstratie voordat zij met levende dieren gaan werken. [Hier betreft het een live demonstratie en instructie door de docent. Diergeneeskunde studenten hebben al enige ervaring met het hanteren en bestuderen van ratten en muizen door practica die eerder in het curriculum zijn gegeven.](#) Onervaren personen worden tijdens het praktische onderwijs intensief begeleid door ervaren docenten.

De opzet van het practicum is hierboven beschreven. Technieken die in de practica aan bod kunnen komen zijn fixatie, isolatie van soortgenoten voor maximaal 12 uur (in het geval spelgedrag bestudeerd wordt, dit om de motivatie om te spelen te verhogen), injectietechnieken (subcutaan of intraperitoneaal, 1 maal per practicum), toediening van psychofarmaca, die invloed hebben op het beloningssysteem (dopamine receptor (ant)agonist, mu-opioid receptor (ant)agonist, dopamine heropname remmer) of cognitieve processen (noradrenaline receptor (ant)agonist, noradrenaline heropname remmer), en plaatsing in een observatiekooi.*

Bovenstaande technieken, aard en frequentie zullen in meer detail worden afgestemd met de IvD.

[*Ter illustratie: Het huidige practicum is gericht op neurobiologie van spelgedrag en bevat sociale isolatie \(max 12h\) en s.c. injectie van methylfenidaat of placebo waarna de dieren met een spelpartner in een observatiekooi worden gezet. Het effect van deze stof op het gedrag wordt bestudeerd.](#)

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

Het aantal dieren dat gebruikt wordt, wordt bepaald aan de hand van het aantal cursussen waarin de practica gegeven worden en het aantal dieren wat minimaal nodig is om een dergelijke kleine experimentele opzet te (laten) maken. Dit betreft een keuzecursus voor masterstudenten [die uit belang en interesse een bewuste keuze voor dit onderwijs hebben gemaakt, mede in het licht van hun carrière](#). Tevens worden de dieren hergebruikt in andere practica van deze projectaanvraag, waardoor het totaal aantal gebruikte dieren niet toeneemt.

B. De dieren

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

Er zal maar een relatief klein aantal dieren worden gebruikt in de practica zoals beschreven in deze bijlage. In het huidige practicum worden 21 dagen oude mannelijke ratjes besteld van een erkende proefdierfokker omdat jonge dieren nodig zijn voor het bestuderen van spelgedrag. Afgelopen jaren hebben we 32 ratten per jaar gebruikt hiervoor, 16 dieren per cursus. Dit aantal is noodzakelijk voor het maken van voldoende spelkoppels en groepen. Om wat speling te houden voor het geval er mogelijke veranderingen in frequentie waarin de cursussen worden aangeboden schatten wij het aantal dieren wat hoger in (op basis van 3 extra cursussen in 5 jaar), dan komen we op $16 (\text{aantal dieren}) * 13 (2 \times 5 + 3 \text{ cursussen in vijf jaar}) = 208 \text{ ratten}$. Als de practica zijn afgelopen draaien deze dieren verder mee in het onderwijs van de afdeling, er zijn dus geen extra dieren nodig en het voordeel is dat de dieren al gehabitueerd zijn aan hanteren.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vervanging

Om te leren een neurobiologisch gedragsexperiment op te zetten en uit te voeren is werken met levende dieren het meest geschikte middel. Diergedrag en de neurobiologische mechanismen daarvan zijn complex en lastig na te bootsen met bijvoorbeeld simulaties. Bovendien is juist door het gebruik van dieren aandacht voor bewustwording over hoe je op verantwoordelijke wijze proefdieren in kunt zetten. Er wordt tijdens de practica aandacht besteed aan alle facetten die hierbij belangrijk zijn, zoals het maken van een ethogram, observatiemethode, standaardisatie, randomisatie, blinderen, statistiek en interpretatie van resultaten, het kritisch nadenken over de proefopzet en hoe je op die manier relevante en betrouwbare resultaten kunt vergaren.

Mogelijke vervanging zou zijn het gebruiken van videomateriaal, maar daarmee heb je niet het gehele experimentele proces van opzet en uitvoer naar het analyseren en discussieren van de resultaten bij elkaar. Juist door het zelf uitvoeren van een practicum, waarbij de studenten zelf moeten plannen, randomiseren, uitvoeren en interpreteren worden de kritische stappen van neurobiologisch gedragsonderzoek inzichtelijk gemaakt voor studenten. Om het leerdoel te halen is er daarom voor gekozen een practicum met echte dieren te doen.

Vermindering

Het aantal dieren dat gebruikt wordt is tot een minimum beperkt. Als voorbeeld: in het huidige practicum worden 16 dieren per keer ingezet: er zijn dan 8 spelkoppels te maken waarvan er 4 koppels een controle behandeling krijgen en 4 koppels een experimentele behandeling, met minder kun je geen zinvolle conclusies trekken vanwege de lage n.

Verfijning

Studenten hebben al meermaals dieren geobserveerd in andere onderdelen van de studie, tijdens het practicum krijgen zij eerst een demonstratie van de docent bij het oppakken en/of injecteren van de dieren, er zijn twee docenten bij het practicum aanwezig om de studenten goed te begeleiden en het welzijn van de dieren tijdens het practicum goed in de gaten te houden.

Omdat de dieren voor langere tijd meedraaien in het onderwijs krijgen zij meer verrijking aangeboden dan standaard is in het dierenlaboratorium.

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.

Tijdens de practica zullen ervaren docenten de technieken demonstreren en 1-op-1 begeleiding geven bij het uitvoeren van de handelingen. Gedrag van de dieren wordt bestudeerd. Als er indicaties zijn van complicaties als gevolg van de handelingen zal dit meteen opvallen en zullen maatregelen genomen worden om ongerief van het dier te beperken.

Er worden geen negatieve milieueffecten verwacht

Herhaling en duplicering

E. Herhaling

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

Nvt.

Huisvesting en verzorging

F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

In geval er spelgedrag wordt bestudeerd worden jonge ratjes kortstondig (maximaal 12 uur per keer) sociaal geïsoleerd om de motivatie voor spelgedrag te verhogen. Zij kunnen dan wel elkaar zien en ruiken.

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.

Kortstondige pijnprikkel bij injectie, het zou meer ongerief geven om ook nog pijnstilling toe te dienen

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

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

- 1) Kortstondige sociale isolatie van kan een aantasting met zich meebrengen
- 2) De effecten van farmaca zouden het welzijn van de dieren in lichte mate negatief kunnen beïnvloeden

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1) Ratten zijn sociale dieren en spel is in die periode belangrijk (hetgeen wat bestudeerd wordt in het practicum). Bij hereniging met een spelpartner en kooigenoten krijgt dit gedrag wel weer een boost (spelen is belonend)

2) Psychofarmaca beïnvloeden hersenprocessen, en kunnen bijvoorbeeld (afhankelijk van de stof) emotionele perceptie, cognitie en gedrag van de dieren beïnvloeden

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

Dieren worden geobserveerd na de injectie (gedrag observatie is onderdeel), afwijkingen zullen dus direct opvallen. De gebruikte stoffen zijn kortwerkend en worden in lage doses toegediend, zij worden afgebroken in het lichaam en veroorzaken geen blijvende effecten

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.

In deze practica worden de afzonderlijke handelingen niet hoger ingeschat dan "licht" ongerief, dit gaat dan over de kortstondige isolatie, stress door het hanteren en fixeren en kortstondige pijn doordat handelingen uitgevoerd door niet-ervaren personen.

Einde experiment

L. Wijze van doden

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

Nee

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer : 2017.I.818.006
2. Titel van het project : Onderwijs met kleine proefdieren
3. Titel van de NTS : Onderwijs met kleine proefdieren

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: 30-03-2017
 - aanvraag compleet:
 - in vergadering besproken: 05-04-2017
 - anderszins behandeld:
 - termijnonderbreking(en) van / tot : 13-04-2017/20-04-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 - aanpassing aanvraag:
 - advies aan CCD: 04-05-2017

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: 13-04-2017
 - Datum antwoord: 20-04-2017
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Bijlage 1

- C. Hergebruik: De DEC raadt u aan om hier expliciet te noemen dat de dieren uit bijlage 2 hergebruikt worden in bijlage 1.

Er is nu onder dit kopje genoemd dat alle dieren die in de practica van bijlage 2 worden ingezet zullen worden hergebruikt voor de trainingen en practica in bijlage 1.

Bijlage 2

- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: De DEC ziet graag dat u hier nog opneemt dat de farmaca het welbevinden van de dieren in lichte mate negatief zouden kunnen beïnvloeden.

De invloed van farmaca op het welzijn van de dieren is nu ook onder dit kopje aangegeven.

- 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. Deze aanvraag betreft een onderwijsproject waarin practica en trainingen proefdierkunde en diergedrag- en welzijn met kleine proefdieren (muizen en ratten) beschreven staan. Het onderwijs wordt gegeven aan studenten van de opleiding Diergeneeskunde, diverse master en PhD opleidingen en cursisten die een specifieke bij- en nascholing dienen te volgen in het kader van de WOD. De onderwijsaanvraag heeft een concrete onderwijsdoelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 5 uit de handreiking 'Invulling definitie project' van de CCD. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvraag heeft een duidelijke opbouw waarin is aangegeven dat pas na een voortraject (theorie, alternatieven zonder levende dieren), levende dieren worden ingezet. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden.

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie sluit aan bij de hoofddoelstellingen.

Belangen en waarden

4. Dit onderwijs is opgezet voor de opleiding Diergeneeskunde, diverse master en PhD opleidingen en functie specifieke bij- en nascholing in het kader van de WOD, met als direct, algemeen doel de cursisten meer bewust te maken van het belang van dierenwelzijn en de intrinsieke waarde van dieren. Daarnaast komen in het kader van proefdierkunde, diergedrag en welzijn de volgende specifieke doelen naar voren: 1) het kennis maken en oefenen met: fixeren, injectietechnieken, orale gavage en andere toedienings- en (bloed) afnametechnieken bij de muis en de rat en 2) kennis en inzicht verschaffen met betrekking tot normaal diergedrag, de relatie met dierenwelzijn en de neurobiologische mechanismen die hieraan ten grondslag liggen. Cursisten en studenten zullen zich pas echt bewust worden van de effecten van hun handelingen op levende dieren (en hun verantwoordelijkheden in dat opzicht) als ze deze ook zelf op dieren kunnen uitvoeren. Dit zal er toe bijdragen dat muizen en ratten op een verantwoorde en zorgvuldige manier gebruikt worden in dierproeven.
5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren in dit project, proefdieren in het algemeen, het wetenschappelijk onderzoeksveld en de studenten/cursisten. Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren kunnen, als gevolg van de handelingen die ze ondergaan, stress en pijn ondervinden en in hun natuurlijke gedrag worden aangetast. In het kader van het onderwijs onder terminale anesthesie in bijlage 1 zullen de dieren gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven. Proefdieren in het algemeen hebben er belang bij dat de uitvoerders van experimenten oog hebben voor dierenwelzijn en goed getraind zijn in het waarborgen daarvan. Voor de cursisten/studenten geldt dat het aanleren van nieuwe vaardigheden en de bewustwording van het belang van dierenwelzijn en de intrinsieke waarde van een dier bijdraagt aan hun scholing en verdere loopbaan mogelijkheden, maar dit dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Los van deze belangen van de direct betrokkenen is er een algemeen, maatschappelijk belang dat verband houdt de kwaliteit van biomedisch onderzoek met proefdieren. Het is voor het wetenschappelijk onderzoek van groot belang dat personen die met proefdieren werken de handelingen met de proefdieren goed beheersen en deze met zo min mogelijk variatie en zo min mogelijk ongerief voor de dieren kunnen verrichten. Dit onderwijs draagt daaraan bij.
6. De aanvrager geeft aan geen nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de docenten en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de onderwijsdoelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

8. De opzet van het project sluit logisch en helder aan bij de aangegeven onderwijsdoelstellingen en kan leiden tot het behalen van de doelstellingen binnen het kader van het onderwijs. In de onderwijsaanvraag is helder uiteengezet op welke manier het onderwijs met kleine proefdieren voor de opleiding Diergeneeskunde, diverse master en PhD opleidingen en functie specifieke bij- en nascholing in het kader van de WOD is opgebouwd, en welke plaats de beschreven practica en trainingen daarbij innemen. Ook de ratio van (de fasering van) de verschillende type dierproeven is duidelijk toegelicht. De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de onderwijsdoelstellingen binnen de gevraagde termijn te realiseren.

Welzijn dieren

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

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

De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd en de aanvrager voldoet aan de in de Wet op de dierproeven, voor de desbetreffende categorie, genoemde beperkende voorwaarden. De ratten die worden gebruikt voor practica diergedrag en welzijn (bijlage 2) worden hergebruikt voor de in bijlage 1 beschreven trainingen en practica. In bijlage 1 kunnen ook surplus dieren uit ander onderzoek gebruikt worden mits ze in een goede conditie zijn, niet teveel ongerief hebben ervaren in voorgaande proeven en niet te oud zijn. Voor trainingen op dode dieren en dieren onder terminale anesthesie is dat geen vereiste. De DEC is vanuit ethisch gezichtspunt van mening dat het hergebruiken van dieren voor dit soort onderwijs, waarbij geen speciale eisen aan de dieren worden gesteld, de voorkeur verdient boven het bestellen of fokken van nieuwe dieren.

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, met uitzondering van bestudering van het spelgedrag van jonge ratten. In dat geval worden de ratten kortstondig sociaal geïsoleerd om de motivatie voor spelgedrag te verhogen. Ze kunnen elkaar wel zien en ruiken.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. In bijlage 1 is het ongerief licht als gevolg van stress door het hanteren en fixeren en kortstondige pijn door biotechnieken, uitgevoerd door niet-ervaren personen. Mede door de hoeveelheid dieren die men ter beschikking heeft, de habituatie die de dieren laten zien aan het hanteren en de rusttijden die in acht worden genomen, wordt het ingeschatte cumulatieve ongerief niet overstegen. In bijlage 2 is het ongerief licht als gevolg van stress door kortstondige isolatie en het hanteren en fixeren en kortstondige pijn door toediening van psychofarmaca en doordat handelingen (injectietechnieken (subcutaan of intraperitoneaal, 1 maal per practicum)) worden uitgevoerd door niet-ervaren personen.
12. De integriteit van de dieren wordt in bijlage 1 fysiek aangetast. De dieren ondergaan verschillende (niet-)chirurgische handelingen en een deel van de dieren wordt aan het einde van het practicum gedood ten behoeve van het oefenen van dodingsmethoden. In bijlage 2 worden de integriteit fysiek en gedragsmatig aangetast. De fysieke aantasting wordt veroorzaakt door het demonstreren en trainen van de diverse technische handelingen. De integriteit wordt gedragsmatig aangetast doordat het natuurlijke gedrag van het dier beperkt wordt door solitaire huisvesting of wordt beïnvloedt met behulp van farmaca.
13. De humane eindpunten zijn voor iedere bijlage dierproeven goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. In bijlage 1 wordt een dier uit de proef genomen wanneer naar het oordeel van de docent of verzorger dieren ernstig trauma hebben opgelopen door verkeerd fixeren of het toepassen van verkeerde biotechnieken. De verwachting is dat dit bij <1% van de dieren gebeurt. Vanwege de opzet van het onderwijs worden in bijlage 2 geen humane eindpunten verwacht.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Binnen het onderwijs in bijlage 1 wordt veel gebruik gemaakt van alternatieven. Zo wordt voor het leren hechten gebruik gemaakt van een oude fietsband en een spons, wordt het aanprikken van de laterale staartvene geoefend op een plastic rat en worden operatietechnieken eerst geoefend op dode dieren. Daarnaast wordt er veel gebruik gemaakt van foto- en videomateriaal waarin de hanteermethoden en operatietechnieken gedemonstreerd worden. Ook wordt er binnen het onderwijs in bijlage 1 veel aandacht besteed aan de 3V's. In de cursus proefdierkunde zit een college 3V's en een college waar de nadruk ligt op zoekstrategieën naar 3V methoden. In de nabije toekomst zal ook gebruik gemaakt gaan

worden van plastinaat modellen van de rat en de muis om tijdens practica technieken en anatomie te demonstreren.

Voor het opzetten en uitvoeren van het neurobiologisch gedragsexperiment in bijlage 2 is een model met levende dieren het meest geschikt. Diergedrag en de neurobiologische mechanismen zijn te complex om, bijvoorbeeld, *in silico* na te bootsen. Daarnaast heeft het gebruik van levende dieren ook een ander doel, namelijk aandacht voor bewustwording over hoe proefdieren ethisch verantwoord kunnen worden ingezet.

Voor beide bijlagen geldt derhalve dat het, om biomedisch onderzoekers in de volle breedte op te kunnen leiden, van groot belang is dat zij tijdens hun studie/cursus ervaring opdoen met het verrichten van handelingen bij levende dieren. De handelingen die tijdens de practica aan bod komen zijn essentieel voor de latere beroepsuitoefening, en er zijn geen volwaardige alternatieven beschikbaar die het onderwijs met levende dieren geheel kunnen vervangen.

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. Het aantal dieren is berekend op basis van het aantal gebruikte dieren in de afgelopen 3 jaar en het verwachte aantal te geven cursussen. Door de dieren in meerdere practica in te zetten wordt het aantal zoveel mogelijk beperkt. Hierbij is de afweging gemaakt: minder dieren met iets meer ongerief (maximaal licht) versus meer dieren met iets minder ongerief (eveneens licht). Verdere vermindering van het aantal dieren zou wel tot een te hoge belasting van de dieren leiden. Daarnaast wordt zoveel mogelijk gebruik gemaakt van surplus dieren.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. Door de studenten en cursisten zo goed mogelijk voor te bereiden middels instructievideo's, live demonstraties, etc. kunnen zij de handelingen beter uitvoeren, wat een verfijning is voor de dieren. Gedurende het onderwijs is er continu toezicht en begeleiding van twee docenten, krijgen de dieren extra kooiverrijking aangeboden en worden er voldoende dieren op voorraad gehouden zodat de dieren voldoende rusttijd krijgen. Daarnaast is de onderwijsgroep voortdurend bezig om het onderwijs te verfijnen. Zo is recentelijk de i.p. injectietechniek iets aangepast zodat deze wat makkelijker uit te voeren is voor studenten en de muizen minder lang gefixeerd hoeven te worden. Er is gekozen voor het gebruik van muizen en ratten omdat dit de meest gebruikte diersoorten zijn als het gaat om proefdieronderzoek en de expertise van de onderzoeksinstelling ligt bij deze diersoorten.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Er zullen in bijlage 2 alleen mannelijke ratten gebruikt worden. De aanvrager heeft dit niet onderbouwd. Dit hangt echter samen met het feit dat bekend is dat er een duidelijk verschil in spelgedrag is tussen jonge vrouwelijke ratten en jonge mannelijke ratten. De DEC is er van overtuigd dat er goede onderwijskundige en wetenschappelijke redenen zijn om deze specifieke proeven met alleen mannelijke dieren uit te voeren. Het gaat om een relatief klein deel van het totaal aantal dieren in dit project. In bijlage 1 worden wel dieren van beide geslachten gebruikt.
19. De dieren die worden gebruikt voor de training onder terminale anesthesie worden in het kader van het project gedood. Bij deze training komt het oefenen van chirurgische technieken op dode dieren of onder terminale anesthesie en/of dodingsmethoden bij ratten en muizen aan bod. De dieren worden volgens een, bijlage IV van de EU richtlijn, passende methode gedood. De dieren die gebruikt worden voor het overige onderwijs worden niet gedood in het kader van dit onderwijs. Zij worden na afloop aangeboden als surplus voor terminale experimenten, weefsel verzameling of voor het ontwikkelen van plastinaten.
20. Omdat in het projectvoorstel muizen en 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 onderwijs de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de gebruikte proefdieren kan rechtvaardigen.
2. Er vindt een beperkte aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met licht ongerief. Daar staat tegenover dat deze practica een belangrijke bijdrage leveren aan de kennis, ontwikkeling en vaardigheden van studenten/cursisten en daarmee een onmisbaar onderdeel vormen voor het verrichten van biotechnische basis handelingen bij proefdieren. Studenten diergeneeskunde, studenten van diverse masteropleidingen en mensen die een PhD doen leren tijdens hun studie niet of nauwelijks over het werken met proefdieren en het opzetten van een dierproef, maar hebben daar in de latere beroepsuitoefening wel regelmatig mee te maken. Daarom is het opdoen van praktische kennis over hoe een goede dierproef moet worden opgezet, hoe basis biotechnische handelingen worden verricht en hoe dieren zich normaliter gedragen, de relatie met dierenwelzijn en de neurobiologische mechanismen die hieraan ten grondslag liggen, van groot belang en de DEC kent daar veel gewicht aan toe. Deze opleiding richt zich daarnaast ook op het bewust maken van het belang van dierenwelzijn en de intrinsieke waarde van dieren. Een proefdier is niet slechts een instrument om

onderzoeksdoelstellingen te behalen. Een belangrijk punt is ook dat het goed aanleren van het verrichten van biotechnische handelingen van invloed kan zijn op de vermindering van het aantal proefdieren en verfijning van de dierproeven, doordat minder dieren uitvallen en de handeling correct worden uitgevoerd. Ook het correct opzetten van een dierproef kan leiden tot vermindering van het aantal proefdieren. De DEC kent hier eveneens veel gewicht aan toe. Het is aannemelijk dat de leerdoelstellingen behaald zullen worden. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de docenten doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken. Waar mogelijk worden surplus dieren en vervangingsalternatieven ingezet.

3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het aanleren van de handelingen en de bewustmaking van het belang van dierenwelzijn en de intrinsieke waarde van dieren die tijdens de practica aan bod komen, essentieel zijn voor de latere beroepsuitoefening en dat derhalve dit onderwijs een substantieel belang vormt dat opweegt tegen de geringe 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
AVD1080020171926

Bijlagen

2

Datum 30 mei 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 30 mei 2017. Het gaat om uw project "Onderwijs met kleine proefdieren". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1080020171926. 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:

30 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1080020171926

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
30 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020171926

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

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

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
30 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020171926

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 augustus 2017
Geplande einddatum: 31 juli 2022
Titel project: Onderwijs met kleine proefdieren
Titel niet-technische samenvatting: Onderwijs met kleine proefdieren
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

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: Utrecht
Datum: 30 mei 2017

Datum:
30 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020171926



> 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
AVD1080020171926
Bijlagen
2

Datum 30 mei 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 30 mei 2017
Vervaldatum: 29 juni 2017
Factuurnummer: 171926
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1080020171926	€ 1.287,00

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



Van: [redacted]
Verzonden: donderdag 24 augustus 2017 14:43
Aan: [redacted]
Onderwerp: FW: aanhouden aanvraag AVD1080020171926

[redacted]
Uitvoeringsexpert

Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

.....
Bezuidenhoutseweg 73 2594 AC Den Haag
Postbus 20401 2500 EK Den Haag
.....

[redacted]
[redacted]

Afwezig op vrijdag in de oneven weken

Van: Info-zbo
Verzonden: dinsdag 4 juli 2017 9:21
Aan: info@ivd-utrecht.nl; [redacted]
CC: Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
Onderwerp: aanhouden aanvraag AVD1080020171926

Geachte [redacted]

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning gedaan, bij de behandeling hiervan zijn er een aantal vragen. Het betreft uw project 'Onderwijs met kleine proefdieren' met aanvraagnummer AVD1080020171926. U beschrijft in uw aanvraag onderwijs aan zeer verschillende groepen studenten/medewerkers waarbij het aannemelijk is dat voor elke doelgroep andere leerdoelstellingen zijn gesteld. Dit komt niet voldoende naar voren in uw aanvraag. De bijlage dierproeven zijn relatief algemeen gesteld en ook hier ontbreekt de koppeling naar de verschillende doelgroepen en opleidingseisen.

Er zijn bij de CCD meerdere aanvragen ingediend om te kunnen voorzien in de opleiding van medewerkers, studenten en onderzoekers in opleiding. De eerste van deze aanvragen is door de CCD in overleg met de aanvrager gesteld als voorbeeld aanvraag omdat deze de informatie bevatte waaraan een dergelijke aanvraag naar de mening van de CCD moet voldoen om een duidelijk onderscheid te maken tussen de verschillende doelgroepen en voldoende inzicht te hebben in de procedures welke de individuele dieren ondergaan en welke keuzes voor welke doelgroep daaraan ten grondslag liggen.

U kunt eventueel voor een voorbeeld aanvraag contact opnemen met [redacted]. Ik heb hiervoor de instemming om deze informatie te delen.

Wij willen u vragen uw aanvraag aan te vullen met de ontbrekende informatie,

Met vriendelijke groet, [redacted]

Namens **Centrale Commissie Dierproeven**
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

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

Geachte [REDACTED],

Naar aanleiding van het aanhouden van onze CCD aanvraag “onderwijs met kleine proefdieren” (AVD1080020171926) heb ik op basis van de gestelde vragen de projectaanvraag en de bijbehorende bijlagen aangepast. Hieronder een korte omschrijving van de wijzigingen:

1. Er bleek verheldering nodig over de leerdoelen behorend bij de verschillende doelgroepen (studenten/medewerkers).
→ In de projectaanvraag heb ik nog duidelijker de doelen en de samenhang daartussen aangegeven. De CCD geeft aan het aannemelijk te vinden dat er zeer verschillende leerdoelen zijn tussen de doelgroepen, dit is echter minder uiteenlopend dan het wellicht doet voorkomen. Ten eerste omdat het leerdoel “bouwen aan attitude ten opzichte van (proef)dieren” op alle groepen en alle contexten van toepassing is, omdat dit belangrijk is voor iedereen die met dieren gaat werken of al werkt. Daarnaast is het zo dat diergeneeskundestudenten gelijksoortig onderwijs ontvangen als extracurriculaire cursisten van de proefdierkundecursus, alleen is dit bij hen verweven in het curriculum. Zij halen eenzelfde art. 9 bevoegdheid als ze slagen voor het examen proefdierkunde en afgestudeerd zijn. Daarnaast zitten er inderdaad ook andere doelen bij, en deze hebben te maken met activiteiten van onze afdeling: onze missie is bij te dragen aan het verbeteren van dierenwelzijn. Dit doen wij onder andere door (1) onderwijs te geven hierover én (2) wetenschappelijk onderzoek te doen naar (neurobiologische mechanismen van) gedrag en welzijn. In ons onderwijs komen ook practica aan bod die als doel hebben hier inzicht in te verschaffen (keuzevak master diergeneeskunde), daarnaast komt het voor dat er stafleden en stagiaires (biotechnici, onderzoekers, HBO/WO studenten) getraind moeten worden in technieken die ze bij dit onderzoek nodig hebben. In de aanvraag heb ik dit bekwaamheidstrainingen genoemd.
2. De CCD vond de bijlagen “relatief algemeen gesteld” en de koppeling naar de doelgroepen en opleidingseisen ontbrak
→ Ik heb de bijlagen in meer detail opgesteld, gebaseerd op de technieken die wij in ons huidige onderwijs en trainingen gebruiken. Omdat toekomstige ontwikkelingen in het onderzoek of onderwijs ook effect zullen hebben op de gedoede technieken, kan het in een periode van vijf jaar echter voorkomen dat er ook andere technieken aan bod gaan komen die nu nog niet voorzien zijn. Mocht dit het geval zijn zullen wij dit als wijziging bespreken met de IVD en indien zij dat noodzakelijk achten dit ook melden bij de CCD. Verder heb ik nu in de bijlagen de leerdoelen van de verschillende onderdelen en de doelgroepen besproken. Ook opleidingseisen die wij hebben voor een cursus komen aan bod in de projectaanvraag en de bijlagen.

Voor de duidelijkheid heb ik de delen die gewijzigd zijn in de projectaanvraag en de bijlagen in het blauw gezet. Ik hoop hiermee de onduidelijkheden die er nog waren te hebben verhelderd zodat de vergunningaanvraag doorgezet kan worden,

Met vriendelijke groet

[REDACTED]

Overzicht practica per jaar							
Onderwijsonderdeel	aantal practica fixeren	aantal practica technieken	training bekwaamheid	max deelnemers (per cursus)	periode	aantal cursus/jaar	Aantal ratten/muizen Inzet half jaar*
extracurriculair PDK	22	22		24	Sept-jul	11	48/240
stationstoetsen	2				Jan en jun	2	16/40
bachelor DDS	15			225	sept-dec	1	48/240
master VP		16		50	sept-okt- jan-mei	4	48/240
trainingen Neurobiologie van gedrag			8	10	hele jaar door	8	40/40
Gedrag (blok 16), geen dierproef		3		24		2	16/0
				225	Jun	1	48/240

Op basis van dit overzicht is te zien dat er bepaalde periodes zijn dat er meer intensief onderwijs gegeven wordt met de dieren. Met name in het september-december, jan-feb en juni/juli zijn drukke periodes waarin wij dubbele aantallen dieren dan nodig zijn in 1 practicum nodig hebben, vereiste rusttijden van minimaal 1 dag kunnen dan in acht worden genomen. Per practicum (meestal 12, max 15 deelnemers) worden 120 muizen en 24 ratten ingezet. Ratten gaan gemiddeld ongeveer 5/6 maanden mee (dat kan langer zijn, maar als surplus worden gebruikt is dit korter), en muizen driekwart jaar gemiddeld.

*In deze kolom staat een schatting van het aantal ratten en muizen dat door de frequentie van practica van de betreffende cursus ingezet moet worden om een minimale rusttijd van 1 dag in acht te kunnen nemen.

Berekening: op basis van voortzetting van de practica zoals dit nu gebeurt hebben wij 48 ratten en 240 muizen nodig per half jaar. Op basis van deze redenatie en verwachte levensduur hebben wij 108 ratten en 360 muizen per jaar nodig dit is ongeveer in overeenstemming met de aantallen die we afgelopen jaren hebben gebruikt, zie berekening in de bijlagen dierproeven waar onze uiteindelijke aantallen in staan.



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

AVD1080020171926

Bijlagen

1

Datum 27 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte ██████████,

Op 30 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Onderwijs met kleine proefdieren" met aanvraagnummer AVD1080020171926. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Wij hebben u op 4 juli 2017 gevraagd de leerdoelen voor de verschillende doelgroepen te verhelderen en in de bijlagen dierproeven ook de relatie tussen de doelgroepen en verschillende leerdoelen meer te beschrijven.

U heeft op 25 juli 2017 een herziene meer uitgewerkte versie van de projectaanvraag ingediend.

Beslissing

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

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

U kunt met uw project "Onderwijs met kleine proefdieren" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 4 mei 2017. Bij de beoordeling

van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Datum:
27 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020171926

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



Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
27 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1080020171926



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Utrecht

Adres: Postbus 12007

Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 augustus 2017 tot en met 31 juli 2022, voor het project "Onderwijs met kleine proefdieren" met aanvraagnummer AVD1080020171926, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. Er worden aanvullend algemene voorwaarden gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Docent.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 30 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 juli 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 25 juli 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 4 mei 2017, ontvangen op 30 mei 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 25 juli 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Trainingen en practica invasief				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	1.800	100% Licht	
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	402	100% Licht	
3.4.4.2 Practica diergedrag- en welzijn				
	Ratten (<i>Rattus norvegicus</i>) /	208	100% Licht	

Aanvraagnummer:

AVD1080020171926

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:

AVD1080020171926

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:

AVD1080020171926

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

Inventaris Wob-verzoek W17-12									
nr.	documenten NTS20171944	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven				x			x	
5	DEC-advies				x			x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
8	Reactie verzoek aanvulling				x		x	x	
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	

1944



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in	11500
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	UMC Utrecht
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	30244197
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht
		Postbus	12007
		Postcode en plaats	3501AA Utrecht
		IBAN	NL27INGB0000425267
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Universiteit Utrecht
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	Onderzoeker
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

(Titel) Naam en voorletters

Dhr. Mw.

Functie

Afdeling

Telefoonnummer

E-mailadres

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

Ja > Stuur dan het ingevulde formulier *Melding Machtiging* mee met deze aanvraag
 Nee

2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3
 Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn
 Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?

Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier
 Nee > Ga verder met vraag 3

- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?

Nee > Ga verder met vraag 3
 Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?

Startdatum | 1 - 7 - 2017

Einddatum | 30 - 6 - 2022

- 3.2 Wat is de titel van het project?

The role of dendritic cells in experimental sialadenitis as a model for Sjogren's syndrome

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

De rol van dendritische cellen in een muismodel voor het syndroom van Sjogren

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

Naam DEC | DEC Utrecht

Postadres | Postbus 85500 3508 GA Utrecht

E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl

4 Betaalgegevens

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

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening

Utrecht



Format

Projectvoorstel dierproeven

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

1 Algemene gegevens

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

2 Categorie van het project

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

3 Algemene projectbeschrijving

3.1 Achtergrond

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

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

Het primair syndroom van Sjögren (pSS) is een reumatische auto-immuunziekte met als primaire target orgaan de traan- en speekselklieren. pSS komt voor bij een geschatte 0.5% van de populatie in de westerse wereld. Patiënten ervaren droogte van de mond en ogen en een debilerende vermoeidheid. Daarnaast kunnen ook manifestaties buiten de speekselklieren optreden, zoals artritis, en is er een vergrote kans op het ontstaan van een lymfoom bij deze patiënten. Er is op dit moment alleen symptoombestrijding met kunstmatige tranen of speeksel en behandeling van extra-glandulaire manifestaties mogelijk voor deze groep patiënten, ondanks een grote hoeveelheid clinical trials met biologicals in de laatste jaren [Nocturne et al. 2016].

Dendritische cellen (DC) zijn immuuncellen die in het centrum van de ontstekingsrespons staan en een essentiële link vormen tussen het innate en het adaptive immuunsysteem. Ondanks het feit dat deze cellen een relatief klein onderdeel van het totale aantal immuuncellen vormen (nog geen procent van de leukocyten in het perifere bloed) worden ze gezien als enorm invloedrijke cellen bij een immuunrespons, omdat elke DC grote hoeveelheden T- en B-cellen kan activeren en grote hoeveelheden cytokines kan produceren. Er zijn een aantal subsets van DCs, het meest duidelijke gedefinieerd hiervan zijn de plasmacytoïde DCs (pDCs), en twee typen classical DCs (cDCs). pDCs produceren grote hoeveelheden aan Interferon-alpha (IFN- α), wat betrokken is bij de afweer tegen virussen maar ook bij verschillende auto-immuunziekten een rol lijkt te spelen. De cDCs voeren vooral de klassieke functies die aan DCs worden toegeschreven uit, waaronder het activeren van antigen-specifieke T-cellen. cDC1s activeren vooral via cross-presentation de CD8+ cytotoxische T-cellen terwijl de cDC2s vooral de CD4+ T-helper cellen activeren.

Vanuit andere (reumatische) auto-immuunziekten weten we dat DCs lokaal een grote rol kunnen spelen bij chronische ontsteking: [redacted] heeft eerder laten zien dat DCs uit het gewricht van patiënten met reumatoïde artritis enorm potent zijn in het activeren van T-cellen en een grote verscheidenheid aan cytokines en chemokines produceren, die immuuncellen aantrekken en activeren [Moret et al. 2014, Hillen et al. 2017]. In pSS is de rol van DCs echter sterk onderbelicht. We weten dat er minder DCs aanwezig zijn in het bloed van pSS patiënten tov. gezonde controles [Vogelsang et al. 2012] en dat er (geactiveerde) DCs aanwezig zijn in de speekselklieren van patiënten [Gottenberg et al. 2005; Bikker et al. 2010, Vogelsang et al. 2012]. Daarnaast heeft een recent artikel laten zien dat pDCs uit de circulatie van pSS patiënten geactiveerd zijn door IFN- α en TLR-liganden [Maria et al. 2016]. Onze groep heeft de afgelopen jaren veel geïnvesteerd in het in kaart brengen van twee DC subsets in pSS patiënten: We hebben pDCs en cDC2s uit het bloed van pSS patiënten gedetailleerd in kaart gebracht met behulp van [redacted] en hebben een groot aantal processen en pathways gevonden die in deze cellen gedysreguleerd zijn. Zo zien we naast de eerder gepubliceerde verhoogde IFN- α activatie in pDCs ook verschillen in processen die zijn betrokken bij [redacted] [redacted]. Daarnaast kunnen we de verschillen die we in de circulerende DCs vinden linken aan de lokale ontsteking omdat er gepaard speekselklierweefsel beschikbaar is van deze patiënten. Hierin hebben we met onder andere whole-tissue RNA-sequencing en epigenetic cell-counting een gedetailleerd profiel van de ontsteking gecreëerd.

Er is dus veel indirect bewijs voor een belangrijke rol van deze cellen in de pathogenese van pSS. Wat echter nog niet bekend is, is wat voor rol DCs daadwerkelijk spelen in de ziekte. Een groot obstakel hierbij is dat deze cellen lokaal op de plek van ontsteking zeer moeilijk te bestuderen zijn, zowel omdat er weinig tot geen weefsel beschikbaar is voor onderzoek en omdat het om zeer zeldzame cellen gaat. In dit project willen we bekijken wat de rol is van de verschillende DC subsets in een virus-geïnduceerd muis model voor pSS. Daarnaast willen we dit model gebruiken om de rol van specifieke eiwitten die uit ons humane werk naar voren komen te bestuderen.

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?

Gedurende de jaren dat dit project loopt willen we twee dingen bereiken: Ten eerste willen we met behulp van het adenovirus-cannulatie model voor experimentele sialadenitis (ontsteking van de speekselklieren) de rol van de verschillende subsets van DCs in het ontstaan van ontsteking en droogte in dit model achterhalen. Dit omvat zowel de rol van deze cellen bij het aantrekken en activeren van lymfocyten in de [redacted] van het model, als de rol bij het ontstaan van ectopische kliercentra (kliercentra die buiten lymfoïde organen ontstaan), autoantistof-productie en droogte in de latere tijdstippen van het model, die het beeld wat gezien wordt bij pSS patiënten recapituleren. Als tweede willen we met behulp van dit model de functionele relevantie van een aantal van de targets die we in DCs van patiënten hebben ontdekt achterhalen. Door een specifiek gen uit te knocken in een DC subset of een inhibitor van een target toe te dienen kunnen we heel gericht onderzoeken wat *in vivo* de functionele relevantie van een target is. Het effect van de knock-out/inhibitie van een target of pathway zal helpen bij het identificeren van de meest therapeutisch interessante targets voor vervolgonderzoek en het benodigde proof-of-concept leveren om vervolgonderzoek op te baseren.

3.3 Belang

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

Tot nu toe zijn de clinical trials met biologicals in pSS allemaal gefocust geweest op T-cellen en B-cellen, naar het voorbeeld van reumatoïde artritis waar deze therapieën erg goed werken. Deze trials zijn echter voor de primaire symptomen (droogte en vermoeidheid) van pSS gefaald en het is duidelijk dat nieuw perspectief nodig is voor effectieve behandeling van deze patiëntengroep. Als onze hypothese klopt en DCs een belangrijke rol spelen bij de ontsteking in pSS dan levert dit een nieuw celtype op als therapeutische mogelijkheid voor deze patiënten. Daarnaast kan [redacted]

3.4 Onderzoeksstrategie

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

Ter beantwoording van onze onderzoeksvragen willen we in de muis het adenovirus (Adv) cannulatiemodel gebruiken. Hierbij wordt een muis onder narcose gebracht en wordt onder een microscoop met behulp van een 0.1mm grote cannule replicatie-deficiënt adenovirus direct in de submandibulaire speekselklieren gebracht. Het totale experiment duurt maximaal 28 dagen, waarna een beeld dat lijkt op pSS ontstaat, inclusief droogte van de gecannuleerde speekselklieren, systemische productie van auto-antistoffen in 75% van de gecannuleerde muizen, en het ontstaan van ectopische kliercentra in de speekselklieren [Bombardieri, Barone et al. 2012].

Aanvragen heeft eerder onderzocht of DCs in dit model een rol spelen en het model aan te leren. Onze preliminaire data laten zien dat de drie geanalyseerde DC subsets (pDCs, cDC1s, cDC2s) [redacted] We hebben laten zien dat twee van deze subsets de speekselklieren [redacted]; de cDC2s en pDCs. We zijn er dus zeker van dat deze cellen te bestuderen zijn in het gekozen model. Daarnaast hebben we preliminaire data gegenereerd die laten zien dat de [redacted] als de [redacted] wordt voorkomen, een eerste indicatie dat deze cellen inderdaad een rol spelen in het ontstaan van inflammatie in dit model.

Als eerste zullen we de rol van DCs in het ontstaan van de speekselklierontsteking verder onderzoeken. Hiervoor zullen we de aantallen en het fenotype van de drie genoemde DC subsets in de speekselklieren en draining cervicale lymfnodes gedurende het model in detail onderzoeken. Op verschillende tijdstippen gedurende het model worden muizen gedood en worden de beide speekselklieren en draining lymfnodes uit de muis gehaald. Afhankelijk van de vraagstelling worden deze opgeslagen voor immunohistochemie of enzymatisch gedigesteerd waarna met behulp van FACS de verschillende subsets worden geanalyseerd. Daarnaast kunnen we met flowsort de DC subsets isoleren en met behulp van oa.

RT-qPCR en westernblot de cellen in kaart brengen. De andere immuuncelsubsets zijn eerder onderzocht in oa. ██████████ en deze cellen worden hier buiten beschouwing gelaten. Daarnaast willen we met behulp van transgeen/knock-out dieren naar het effect van het afwezig zijn van de verschillende DC subsets dan wel bepaalde functies van de DCs, zoals antigen-presentatie of co-stimulatie. Hierbij kijken we ook naar de aantallen en fenotypes van de andere immuuncellen, waaronder de T cellen waarop we de meest belangrijke effecten verwachten aangezien DCs kritisch zijn voor het activeren van deze cellen.

Als tweede willen we targets die naar voren zijn gekomen in ons humane onderzoek testen in het model. Er zal een go-no-go beslissing plaatsvinden voordat we aan dit deel beginnen: We zullen afwachten totdat we robuuste data genereren in het eerste deel die laten zien dat DCs een rol spelen in de ontsteking in het model. Pas als deze data er zijn zullen we beginnen aan het tweede deel van de aanvraag. We spenderen erg veel tijd en energie aan de voorselectie van deze targets: we kijken naar geïsoleerde celsubsets in plaats van verzamelgroepen (bv. perifere bloed mononucleaire cellen of totale DCs) en verzamelen meerdere data lagen, waaronder ██████████, en zijn alleen geïnteresseerd in die targets die in meerdere van deze lagen terugkomen en die op basis van de literatuur relevant lijken te zijn. Daarnaast gebruiken we uitgebreide ██████████ om te bepalen welke mediators kritisch zijn voor de veranderingen die we in de DCs van de patiënten zien.

We zullen dus targets testen die:

- Duidelijke verschillen laten zien in verschillende data lagen (bijvoorbeeld zowel verhoogd op ██████████ en ook veranderingen in de ██████████ laten zien)
- In onze computational modellen een belangrijke rol spelen in disregulatie van pathways in de cel (denk aan eiwitten die middenin de aangetaste pathways staan en dus niet alleen als gevolg van andere veranderingen in de cel veranderd zijn in patiënten maar waarschijnlijk een van de primaire oorzaken zijn)
- Op basis van de literatuur en/of onze eigen *in vitro* experimenten een relevante rol spelen in de biologie van de DC en de ontsteking in de patiënt.
- Deze criteria worden per werkprotocol getoetst door de IVD.

Op deze manier optimaliseren we de kans dat de gekozen targets een relevante rol spelen *in vivo*. Afhankelijk van de uiteindelijk geselecteerde targets zullen we in muizen die hiervoor transgeen/knock-out zijn, dan wel behandeld worden met een inhibitor tegen deze targets, kijken naar de aantallen en het fenotype van de DCs en de andere immuuncel subsets zoals hierboven beschreven.

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

Het project bestaat uit twee onderdelen, die beiden dezelfde type dierproef gebruiken: het Adv-cannulatie model.

Als eerste willen we verder onderzoeken wat de rol van de verschillende subsets DCs precies is tijdens het ontstaan van het model. Hierbij kijken we naar de aantallen en fenotype van de DCs gedurende het model. Daarnaast kijken we in een aantal transgeen/knockout dieren wat het effect is van het afwezig zijn van de verschillende DC subsets dan wel bepaalde functies van de DCs, zoals antigen-presentatie of co-stimulatie.

Als tweede willen we het model gebruiken om targets te onderzoeken die verschillend tot expressie komen in DCs van patiënten met pSS tov. gezonde controles. Hierbij bekijken we het effect van veranderingen in de expressie of functie van deze targets in een transgeen/knockout dier of na behandeling afhankelijk van de specifieke targets.

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 eerste onderdeel van ons onderzoek is essentieel om te kunnen beginnen aan het tweede deel. Als de DCs geen relevante functie hebben in dit model (wat we niet verwachten, omdat het in tegenstrijd is

met onze preliminaire data) dan is het model niet bruikbaar om de functionele consequentie van de in patiënten gevonden genen die gedisreguleerd zijn te testen. We zullen alleen aan het tweede deel beginnen als we onze preliminaire data kunnen valideren en goede aanwijzingen hebben dat de DCs inderdaad belangrijk zijn in het ontstaan van de pSS-achtige symptomen in het model.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Adenovirus cannulatie model
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Bijlage

Beschrijving dierproeven

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

1 Algemene gegevens

1.1	Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.	11500	
1.2	Vul de naam van de instelling of organisatie in.	UMC Utrecht	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
		1	Muis Adv-cannulatie

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.

We kiezen voor het adenovirus (Adv)-cannulatie model voor experimentele sialadenitis in de muis omdat dit een van de weinige modellen voor het primair syndroom van Sjögren (pSS) is dat niet spontaan is, maar geïnduceerd. Dit staat ons toe om ook de [redacted] de inflammatoirespons te bestuderen, waarin we verwachten dat DCs een belangrijke rol spelen. Daarnaast recapituleert het de belangrijkste onderdelen van pSS, waaronder droogte, speekselklier ontsteking met focale lymfocyttaire infiltratie, ontwikkeling van autoantistoffen en het ontstaan van ectopische kliercentra. Dit laatste is in patiënten een belangrijke voorspeller voor het ontstaan van lymfoom, wat de meest serieuze complicatie is van deze ziekte.

Primaire uitkomstparameters zijn infiltratie van lymfocyten op verschillende tijdstippen (gemeten met FACS; absolute en relatieve aantallen), het ontstaan van lymfocyttaire aggregaten (gemeten met immunohistochemie) en ectopische kliercentra (gemeten met immunohistochemie en immunofluorescentie), het ontstaan van autoantistoffen (gemeten met ELISA).

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

De dieren worden eenmalig gecannuleerd in één of beide submandibulaire speekselklieren met een replicatie deficient adenovirus. Dit gebeurt onder algehele narcose. De dieren krijgen subcutaan warme saline geïnjecteerd vlak na de operatie om uitdroging te voorkomen. In het tweede deel van het project waarbij verschillende targets worden getest zal een deel van de muizen geïnjecteerd worden. Afhankelijk van het te testen target zullen frequentie en locatie van injectie verschillen. Een aantal dieren wordt niet gecannuleerd en dient als negatieve controle (T=0) of wordt doodgemaakt vlak voor de cannulatie voor het opzetten van het model of het trainen van personeel.

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

We investeren zeer veel tijd in de selectie van de targets om te testen en zorgen ervoor dat er zeer sterke aanwijzingen voor relevantie zijn voordat targets worden getest in vivo. Daarnaast gebruiken we de speekselklieren aan beide kanten van dezelfde muis als een separate experimentele eenheid dan wel interne controle, wat een reductie in het aantal gebruikte muizen geeft.

Met de eerder opgedane ervaring weten we dat we met $n=12$ speekselklieren per groep duidelijke verschillen kunnen waarnemen in [REDACTED] en eventuele effecten op [REDACTED]. Daarnaast zijn relevante verschillen in de primaire uitkomstparameters met deze n -waarde ook te detecteren. Omdat we de beide speekselklieren als losse experimentele eenheid gebruiken betekent dit dat we $n=6$ muizen per experimentele groep nodig hebben.

B. De dieren

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

We gebruiken vrouwelijke muizen van tussen de 8 en 12 weken oud in onze experimenten. Een deel hiervan is transgeen dan wel knock-out. pSS is zeer ongelijk verdeeld tussen mannen en vrouwen, met een man:vrouw ratio van 1:9. Daarnaast is het model bij mannelijke dieren veel minder consistent dan het bij de vrouwelijke dieren is, en er is veel grotere spreiding in alle afleesparameters. Daarom kiezen we ervoor om alleen vrouwelijke dieren te gebruiken.

Als allereerste willen we een aantal muizen gebruiken om het model in Utrecht op te zetten. Daarnaast willen we muizen aanvragen voor het trainen van maximaal drie nieuwe medewerkers (Analisten/OIOs) de komende vijf jaar. Dit zal deels gebeuren met surplus muizen die dood worden gemaakt vlak voor de cannulatie (20 muizen voor opzetten plus 20 per medewerker voor training), en die worden gecannuleerd met inkt zodat meteen visueel duidelijk is of het cannuleren is gelukt. Verder hebben we voor het opzetten van het model 20 muizen nodig die volgens normaal protocol worden gecannuleerd om te controleren of de ontsteking zo verloopt als verwacht. Voor het trainen van nieuwe medewerkers zijn per medewerker 10 dieren nodig die volgens normaal protocol worden gecannuleerd. In totaal vragen we voor dit deel dus $20+20 \times 3 = 80$ surplus muizen aan en daarnaast $20+3 \times 10 = 50$ muizen aan.

We verwachten voor het eerste gedeelte (onderzoeken rol DCs in model) de komende vijf jaar 12 experimenten te doen. Hierbij kijken we naar de aantallen en het fenotype van de DCs in de speekselklieren en lymfe klieren met FACS, het effect van DC functie op het verloop van het model door te kijken naar antigen presentatie en celmigratie, en naar het effect van het [REDACTED]. Hiervoor gebruiken we per experiment 1 groep (cannulatie) en 8 tijdspunten (inclusief $T=0$ als negatieve controle). Dit komt neer op 1 groep \times 8 tijdspunten \times 12 experimenten met 6 muizen per groep = 576 muizen.

Voor het tweede deel (testen targets) verwachten we de komende vijf jaar 5 targets te testen. Per te testen target hebben we, afhankelijk van de opzet, maximaal 3 experimentele groepen nodig (cannulatie, cannulatie + behandeling compound, cannulatie + behandeling compound + specificiteit controle [bv. blocking antibody]), met vijf tijdspunten per groep (inclusief $T=0$ als controle). Deze zullen allen 2 keer gerund moeten worden voor het verzamelen van genoeg materiaal: We hebben één speekselklier nodig voor de analyse van de primaire uitkomstparameters met immunohistochemie/fluorescentie, en een tweede klier voor de gedetailleerde analyse van de DCs met FACS/ flow-sort. Dit komt neer op 3 groepen \times 5 tijdspunten \times 2 experimenten van 6 muizen/groep = 180 muizen per target. 180×5 targets = 900 muizen.

Het virus waarmee we cannuleren wordt door onszelf in batches geproduceerd die elk voor zo'n 50 muizen gebruikt kunnen worden. Elke nieuwe virus batch moet eerst getest worden voordat er experimenten mee worden gedaan. Hierbij kijken we naar het verloop van de lokale ontsteking en de influx van de DCs. Hiervoor gebruiken we 3 muizen en 1 negatieve controle muis. In totaal hebben we hier dus in totaal (exclusief de 80 muizen die met inkt worden gecannuleerd) $(50+576+900)/50 = 31$. 31×4 muizen per test = 124 muizen voor nodig.

In totaal is dit $80+50+576+900+124 = 1730$ muizen, waarvan 80 surplus.

Wat betreft de te gebruiken knock-out en transgene dieren: Omdat de te testen targets nog vastgesteld moeten worden kunnen we momenteel nog geen inschatting geven van het ongerief dat deze dieren door de genetische veranderingen ondervinden. Het ongerief van de te gebruiken knock-out/transgene dieren zal in overleg met de IVD worden vastgesteld en het ongerief zal nooit de maximale ernst van het ongerief zoals in het project beschreven (matig tgv. wakker worden uit anesthesie) overschrijden.

C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

De 80 muizen die worden gecannuleerd met inkt voor het opzetten van het model en trainen van nieuwe werknemers worden doodgemaakt voor de cannulatie. Alleen de leeftijd en het gewicht van deze muizen maakt uit, het gaat hier puur om de mechaniek van het cannuleren van de speekselklier. Dit kunnen vrouwelijke surplus muizen zijn van alle strains met een gewicht van rond de 20 gram met een fenotype dat geen effect heeft op de hoedanigheid van de speekselklieren.

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.

1. We investeren zeer veel tijd in de selectie van de targets om te testen en zorgen ervoor dat er zeer sterke aanwijzingen voor relevantie zijn voordat targets worden getest in vivo. Een deel van de vervanging bestaat uit het uitvoeren van in vitro experimenten met de targets voordat deze in de muizen worden getest. We kijken bijvoorbeeld naar de *in vitro* effecten van knock-out van de targets met behulp van CRISPR-Cas.
2. We gebruiken de speekselklieren aan beide kanten van dezelfde muis als een separate experimentele eenheid dan wel interne controle, wat een reductie in het aantal gebruikte muizen geeft.
3. Door alleen vrouwelijke dieren te gebruiken en zo de spreiding te minimaliseren kunnen we kleinere groepen gebruiken. Daarnaast geeft dit een betere translatie naar de patiëntenpopulatie, die vooral uit vrouwen bestaat.
4. We gaan alleen aan het tweede deel beginnen wanneer we robuuste data genereren in het eerste deel die laten zien dat DCs een rol spelen in de ontsteking in het model. Daarom zijn we er zeker van dat de uitgevoerde experimenten nuttige informatie op zullen leveren.
5. De doelstellingen van dit onderzoek kunnen niet gehaald worden zonder het gebruik van proefdieren, omdat de complexe interacties tussen immuuncellen onderling en die met het weefsel op dit moment nog niet goed genoeg nagebootst. Hierdoor kunnen we niet alle benodigde informatie uit *in vitro* onderzoek halen. We combineren dit onderzoek met *in vitro* analyses van de DCs en de targets waar mogelijk om zo weinig mogelijk dieren te gebruiken.

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

De dieren worden onder volledige anesthesie gebracht gedurende de speekselklier cannulatie, met perioperatieve pijnbestrijding. Ze ondervinden geen zichtbare last van het cannuleren.

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 model wordt uitgevoerd door slechts [REDACTED] Er is geen sprake van duplicatie van dierproeven.

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.

Perioperatieve pijnstilling.; vlak voor cannulatie injectieanesthesie. Muizen worden tijdens en tot een aantal uren na de cannulatie goed in de gaten gehouden.

I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Wellicht treedt droogte van de mond op, dit is niet aan de muizen af te lezen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De cannulatie leidt direct tot minder speekselproductie.

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.

Algemene klinische verschijnselen worden dagelijks gemonitord (houding, gedrag, vachtverzorging, voedingstoestand, etc.). Indien deze algemene klinische verschijnselen duiden op meer ongerief dan vooraf ingeschat en voordat ernstig ongerief zou kunnen ontstaan, dan is het HEP bereikt. Als de muis dagelijks wordt gewogen, is het HEP bereikt bij een gewichtsverlies van 15 % in 2 dagen, of 20% gewichtsverlies t.o.v. het normaalgewicht, of op een ander moment in nauw overleg met dierversorger, proefdierdeskundige, IvD.

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

<1%

K. Classificatie van ongerief

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

90% matig: wakker worden uit anesthesie. 10% licht: dieren voor opzetten model/training en als controle groep, worden doodgemaakt voor begin cannulatie.

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.

Aantal en fenotype van de immuuncellen in de speekselklieren en lymphnodes zijn een belangrijke uitleesparameter in deze experimenten. Het is niet mogelijk om deze uit de muis te halen zonder de muis hiervoor te doden.

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 : 2017.II.514.012
2. Titel van het project : The role of dendritic cells in experimental sialadenitis as a model for Sjogren's syndrome.
3. Titel van de NTS : De rol van dendritische cellen in een muismodel voor het syndroom van Sjögren.

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

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

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

- ontvangen door DEC: 06-04-2017
 aanvraag compleet:
 in vergadering besproken: 19 april 2017
 anderszins behandeld:
 termijnonderbreking(en) van / tot : 25-04-2017/10-05-2017
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag:
 advies aan CCD: 18-05-2017

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

8. Eventueel horen van aanvrager nvt

- 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: 25-04-2017
- Datum antwoord: 10-05-2017

Gestelde vragen en antwoorden: Beste leden van de DEC,

Projectvoorstel

- 3.2 Doel: De DEC raadt u aan namen uit de aanvraag te houden.

Ik heb de namen die in de aanvraag stonden verwijderd.

- 3.4 Onderzoeksstrategie: De DEC zou graag meer weten over de aard en de beschikbaarheid van de transgene en knock-out muizen die gebruikt worden. En leidt de knock-out tot extra ongerief?

Dit is een lastige vraag, omdat de targets nog geïdentificeerd moeten worden. In overleg met de IVD heb ik in de bijlage beschrijving dierproeven onder B een paragraaf opgenomen waarin wordt vermeld dat het ongerief van de te gebruiken knock-outs/transgene dieren in overleg met de IVD wordt vastgesteld en dat dit nooit het ongerief zoals in de aanvraag vermeld (matig) zal overschrijden.

Bijlage 1

- J. Humane eindpunten: Hier staat muis/rat genoemd. De 'rat' graag verwijderen.
Verwijderd.

Niet Technische Samenvatting

- 3.5 Indeling dierproeven naar de verwachte ernst: De percentages die genoemd worden wijken af van de percentages bij onderdeel K in de bijlage. Daarnaast heeft u het over gering ongerief i.p.v. licht ongerief. Graag wijzigen.

Verwachte ernst in beide formulieren aangepast en consistent gemaakt.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is een DEC-lid betrokken bij het betreffende project. Hierbij dient te worden opgemerkt dat deze aanvraag is behandeld in afwezigheid van het DEC-lid.

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang.

Primair Sjögren syndroom (pSS) is een auto-immuun ziekte waarbij primair de traan- en speekselklieren zijn aangetast en die bij ca 0.5% van de westerse bevolking voorkomt.

Patiënten hebben last van droge ogen en mond en chronische vermoeidheid en er is een verhoogde kans op artritis en/of lymfoom. Er is op dit moment alleen symptoombestrijding mogelijk met behulp van kunsttranen of speeksel.

Het is bekend vanuit andere auto-immuun ziekten, dat het immuunsysteem ontregeld is en dat met name dendritische cellen (DC) lokaal een grote rol kunnen spelen bij ontsteking. De onderzoeksgroep van de voorliggende projectaanvraag heeft eerder laten zien dat DC uit het gewricht van patiënten met reumatoïde artritis een belangrijke rol spelen bij de ziekte. De rol van DC bij pSS is tot nu toe nog onderbelicht, maar de groep heeft wel reeds bepaalde type DC uit het bloed van pSS patiënten gekarakteriseerd. Er is in dierexperimenteel onderzoek een link gevonden tussen [REDACTED]. Dit is echter in de patiënt lastig te bestuderen, omdat er geen tot weinig patiënten materiaal beschikbaar is en omdat het om een weinig voorkomende cel populatie gaat. Met behulp van een virus-geïnduceerd muizenmodel voor pSS wil de aanvrager de rol van verschillende DC subsets bestuderen. Daarnaast zullen specifieke eiwitten, die uit het het onderzoek van patiënten naar voren komen, bestudeerd worden. De voorgestelde experimenten zijn naar de mening van de DEC logisch en helder opgeschreven en beargumenteerd, en ze zijn nodig om het beoogde concrete resultaat te bereiken. Alle stappen in het project zijn voldoende uitgewerkt met duidelijke uitkomstparameters en bevatten geen onzekerheden. Gezien bovenstaande is de DEC van oordeel dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft. De aanvraag komt qua structuur overeen met voorbeeld 4B uit de "Handreiking Invulling Definitie Project".

– *De DEC neemt nota dat hier sprake is van reverse translation: er wordt tegelijkertijd in de mens gekeken, dat is mooi onderzoek!*

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

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is om met hulp van het adenovirus-canulatie model voor experimentele sialadenitis de rol van de verschillende subsets van de DC in het ontstaan van ontsteking en droogte van de mond te achterhalen. Hierbij wordt de rol van deze cellen met betrekking tot het aantrekken en activeren van lymfocyten, anti-stof productie en de droogte in de mond onderzocht. Daarmee wordt het gehele proces dat zich ook bij de patiënt voordoet in de diverse stadia samengevat. Daarnaast zal in dit model de functionele relevantie van een aantal ziekte gerelateerde targets, die naar voren komen uit onderzoek in patiënten, worden achterhaald. Al deze gegevens samen zullen inzicht geven in nieuwe behandel strategieën. Dit onderzoek kan worden uitgevoerd door o.a. een specifiek gen uit te knocken in een DC subset, of door een inhibitor van een gen toe te dienen. De DEC is daarom van mening dat er in voldoende mate een relatie is tussen het directe doel en het uiteindelijke doel.

5. De belangrijkste belanghebbenden in dit onderzoeksproject zijn: de proefdieren, het onderzoeksveld en de patiënten met Sjögren syndroom. De morele waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: welzijn (stress) en rechtvaardigheid (intrinsieke waarde en integriteit). De morele waarden die voor de patiënt in de toekomst worden bevorderd zijn: het mogelijk beschikbaar komen van specifieke therapieën. De morele waarden die voor het onderzoeksveld worden bevorderd zijn: wetenschappelijke ontwikkelingen doordat meer inzicht wordt verkregen in de pathogenese van de ziekte.
6. De aanvrager geeft niet aan nadelige effecten op het milieu te verwachten. De DEC ziet geen aanleiding om aan te nemen dat zich toch nadelige effecten zullen voordoen.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De DEC is van mening dat het projectvoorstel aansluit bij recente inzichten en dat het geen belangrijke hiaten bevat die de bruikbaarheid van de resultaten beperken. De groep geniet grote bekendheid op dit gebied en heeft ervaring met het voorgestelde model. Daarom moet het haalbaar zijn dat de resultaten van dit project op termijn leiden tot voldoende kennis over de rol van dendritische cellen bij Sjögren syndroom, en tot verder onderzoek naar een therapeutisch specifieke aanpak. .
8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Het model is algemeen bekend en geaccepteerd als het standaardmodel voor onderzoek naar pSS. Bij dit preklinisch onderzoek zal het aantal en het fenotype van de DC in de speekselklieren ex-vivo worden onderzocht op verschillende tijdstippen. Door gebruik te maken van specifieke genetisch gemodificeerde muizen waarbij subsets afwezig of deels niet functioneel zijn, kunnen specifieke functies zoals antigen presentatie of co-stimulatie goed bestudeerd worden (met behulp van FAC's of immunohistochemie). Daarnaast worden nieuwe targets, die nog geïdentificeerd zullen worden in patiënt, in het muis model worden onderzocht. Met behulp van deze resultaten zullen nieuwe targets in kaart gebracht worden die het aangrijpingspunt zullen zijn van nog te ontwikkelen therapeutica. Er zijn duidelijke go-no/go momenten opgenomen. ██████████ zullen een belangrijke rol spelen bij de selectie van targets, zodat daar geen extra proefdieren voor nodig zijn en de kans van slagen groot is.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU-richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)
 - Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU-richtlijn (13c lid 3)
10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Er wordt éénmalig onder anesthesie een canule in de speekselklier ingebracht waarmee het virus wordt ingebracht om de ziekte op te wekken. Analyse wordt alleen post mortem uitgevoerd op verschillende tijdstippen na canulatie. In het tweede deel worden naast de canulatie ook stoffen toegediend om de DC te kunnen modificeren. Het is mogelijk om materiaal te verzamelen zonder het dier vooraf te doden, maar dan moet dat onder algehele anesthesie worden uitgevoerd. Het dier is echter daarna niet meer bruikbaar voor verder onderzoek. Het is dus logisch dat het dier wordt gedood voor het uitnemen van de speekselklieren. Het ongerief ten gevolge van de canulatie, al dan niet in combinatie met eventuele behandelingen, wordt ingeschat als matig.
12. De integriteit van de dieren wordt fysiek aangetast door de handelingen die in het kader van het experiment uitgevoerd worden zoals het canuleren van de speekselklier onder anesthesie.
13. Men gaat ervan uit dat minder dan 1% van de dieren in het kader van de proef het humaan eindpunt bereikt.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Er is onvoldoende patiënten materiaal beschikbaar om het volledige onderzoek mee te kunnen uitvoeren. De effecten van behandelingen op targets mogen niet in de mens worden uitgevoerd voordat bepaalde gegevens in diermodellen zijn verkregen. De aanvrager heeft helder uiteengezet waarom het noodzakelijk is om met hulp van een muizenmodel de beoogde cel populaties te verzamelen voor het verdere ex-vivo

onderzoek, en dat in het muismodel ook interventies zullen worden toegepast. Voor het selecteren van de juiste targets zal gebruik gemaakt worden van [REDACTED].

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. Een relatief klein deel van de dieren is nodig om het model te valideren en voldoende medewerkers te trainen in de uitvoering van de canulaties. Door de contralaterale speekselklier te gebruiken als controle worden veel dieren bespaard.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van verfijning van dierproeven en het project is zodanig opgezet dat de dierproeven zo humaan mogelijk kunnen worden uitgevoerd. De betrokken onderzoeker heeft elders veel ervaring opgedaan met de uit te voeren experimentele handelingen.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Het voorliggende project heeft betrekking op muizen. Omdat humaan de ziekte bijna 10x vaker voorkomt bij vrouwen dan bij mannen, is hier ook gekozen voor vrouwelijke muizen.
19. De dieren worden gedood in het kader van het project, omdat de doelstelling van het project alleen behaald kan worden wanneer verschillende weefsels post mortem geanalyseerd worden. De dieren worden volgens een passende – en in bijlage IV van de EU richtlijn genoemde – methode gedood.
20. De vraag over hergebruik is niet van toepassing omdat de dieren gedood worden in het kader van het experiment.

NTS

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

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag luidt: rechtvaardigt het belang van het voorliggende project, dat tot doel heeft te onderzoeken wat de rol is van Dendritische Cellen (DC) bij primair Sjögren Syndroom en welke DC subpopulaties daarbij een belangrijke rol spelen om zo

aangrijpingspunten te vinden voor toekomstige therapieën bij humane patiënten, de onvermijdelijke aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren?

2. Er vindt een beperkte aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats, met matig ongerief tot gevolg. Indien de hierboven genoemde doelstelling behaald wordt, dan kan dit project eraan bijdragen dat effectievere behandelmethoden beschikbaar komen voor patiënten met primair Sjögren syndroom. De patiënten zouden baat hebben bij een specifieke therapie, omdat ze dan niet meer levenslang kunsttranen en of speeksel hoeven te gebruiken, en de kans op secundaire ziekten als artritis en speekselklier- of oogontstekingen verkleint. Daarvoor is de inzet van proefdieren noodzakelijk, maar de onderzoekers doen al het mogelijke om het ongerief voor de dieren en het aantal dieren tot een minimum te beperken.
3. Op grond van het bovenstaande is de DEC van oordeel dat het onderzoek naar de rol van DC om nieuwe targets in kaart te brengen voor de behandeling van primair Sjogren syndroom een reëel belang vertegenwoordigt, en dat dit reële belang opweegt tegen de beperkte aantasting van het welzijn en de integriteit van de proefdieren. De meerwaarde van dit onderzoek omvat ook dat het hier zogenaamd 'reversed translation' betreft, aangezien de bevindingen van de mens worden vertaald naar de muis als model/proefdier. 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 dat indien er onverwacht toch ongerief optreedt bij de fok van de knock-out dieren, hiervoor een project vergunning aan te vragen.

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten/dilemma's naar voren gekomen tijdens het beoordelen van de aanvraag en het opstellen van het advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1150020171944

Bijlagen

2

Datum 31 mei 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 31 mei 2017. Het gaat om uw project "The role of dendritic cells in experimental sialadenitis as a model for Sjogren's syndrome". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1150020171944. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

31 mei 2017


Aanvraagnummer:

AVD1150020171944





Datum:
31 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1150020171944

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

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

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
31 mei 2017
Aanvraagnummer:
AVD1150020171944

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 juli 2017
Geplande einddatum: 30 juni 2022
Titel project: The role of dendritic cells in experimental sialadenitis as a model for Sjogren's syndrome
Titel niet-technische samenvatting: De rol van dendritische cellen in een muismodel voor het syndroom van Sjogren
Naam DEC: DEC Utrecht
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

Betaalgegevens

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

Checklist bijlagen

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

Ondertekening

Naam:

Functie:

Plaats:

Datum:



Utrecht

29 mei 2017

Datum:

31 mei 2017

Aanvraagnummer:

AVD1150020171944



> 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
AVD1150020171944
Bijlagen
2

Datum 31 mei 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur
Factuurdatum: 31 mei 2017
Vervaldatum: 30 juni 2017
Factuurnummer: 171944
Ordernummer: CB. 841910.3.01.011

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1150020171944	€ 1035,-

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1150020171944

Datum 9 juni 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Op 31 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The role of dendritic cells in experimental sialadenitis as a model for Sjogren's syndrome" met aanvraagnummer AVD1150020171944. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Niet technische samenvatting

De aantallen van de benodigde dieren in de NTS (n=1596) komen niet overeen met die in de projectaanvraag (n=1730). Graag dit consistent maken.

Onduidelijkheden

- 1) U geeft aan de dieren bij verschijnselen die duiden op ernstig ongerief dagelijks te wegen. Is het mogelijk de humane eindpunten strakker te definiëren zodat ernstig ongerief voorkomen kan worden?
- 2) Kunt u onder vraag D van bijlage 3.4.4.1 onderbouwen waarom de doelstelling niet bereikt kan worden zonder het gebruik van dieren?

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.

Datum:

9 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1150020171944

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

Opsturen binnen veertien dagen

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

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Bijlagen:

- Melding bijlagen

Geachte leden van de CCD, hieronder een puntsgewijze beantwoording van de gestelde vragen.

Niet technische samenvatting

De aantallen van de benodigde dieren in de NTS (n=1596) komen niet overeen met die in de projectaanvraag (n=1730). Graag dit consistent maken.

Het aantal dieren in de NTS vermeld is aangepast.

Onduidelijkheden

1) U geeft aan de dieren bij verschijnselen die duiden op ernstig ongerief dagelijks te wegen. Is het mogelijk de humane eindpunten strakker te definiëren zodat ernstig ongerief voorkomen kan worden?

De beschrijving van het humane eindpunt is strakker gedefinieerd ter voorkoming van ernstig ongerief.

2) Kunt u onder vraag D van bijlage 3.4.4.1 onderbouwen waarom de doelstelling niet bereikt kan worden zonder het gebruik van dieren?

Een vijfde punt is toegevoegd onder vraag D waarin wordt beschreven dat de doelstellingen niet bereikt kunnen worden zonder het gebruik van dieren.

De leges zouden op het moment van versturen van deze reactie afgehandeld moeten zijn.

Ik hoop u zo voldoende geïnformeerd te hebben.

Met hartelijke groet,

██████████



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

Onze referentie

Aanvraagnummer

AVD1150020171944

Bijlagen

1

Datum 3 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 31 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "The role of dendritic cells in experimental sialadenitis as a model for Sjogren's syndrome" met aanvraagnummer AVD1150020171944. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 13 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek zijn de dieraantallen in de NTS consistent gemaakt met die in het projectvoorstel, zijn de humane eindpunten strakker gedefiniëerd en is nader onderbouwd waarom de doelstellingen niet bereikt kunnen worden zonder het gebruik van dieren.

Beslissing

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

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

De voorwaarde betreffende de aanvraag van een nieuwe projectvergunning wanneer ongerief optreedt bij de fok van de genetisch gewijzigde dieren, wordt gesteld om u erop te attenderen dat een fok met ongerief vergunningplichtig is.

U kunt met uw project "The role of dendritic cells in experimental sialadenitis as a model for Sjogren's syndrome" starten. De vergunning wordt afgegeven van 3 juli 2017 tot en met 30 juni 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 18 mei 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

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

Bezwaar

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

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

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

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

Meer informatie

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

Datum:
3 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1150020171944

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
3 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1150020171944



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 3 juli 2017 tot en met 30 juni 2022, voor het project "The role of dendritic cells in experimental sialadenitis as a model for Sjogren's syndrome" met aanvraagnummer AVD1150020171944, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. 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 31 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 13 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 18 mei 2017, ontvangen op 27 mei 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 13 juni 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Muis Adv-cannulatie				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) / waarvan 80 surplus dieren	1.730	90% Matig 10% Licht	

Voorwaarden

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

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen

Aanvraagnummer:
AVD1150020171944

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.

Indien er ongerief optreedt bij de fok van de genetisch gewijzigde dieren, dient hiervoor een projectvergunning te worden aangevraagd.



Aanvraagnummer:
AVD1150020171944

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 onvereenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

Aanvraagnummer:
AVD1150020171944

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 W17-12										
		wordt verstrekt				weigeringsgronden				
nr.	document NTS 20171964	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1	
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x		x	x		
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x						
5	DEC-advies				x		x	x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
7	Aanvullende informatie				x		x	x		
8	Adviesnota CCD		x						x	
9	Beschikking en vergunning				x		x	x		

1964

1.



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

27 JUNI 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 50400 <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	Triskelion BV
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	51382997
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	
		Postbus	844
		Postcode en plaats	3704 HE Zeist
		IBAN	NL101NGB0654470189
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Triskelion B.V.
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 01 - 01 - 2018
- Einddatum 01 - 01 - 2023
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Research for the development of products to treat and prevent influenza virus infection.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Onderzoek voor de ontwikkeling van producten ter behandeling van en bescherming tegen griep.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC-TNO
- Postadres 96800 2509 JE DEN HAAG
- E-mailadres _____

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het? Nieuwe aanvraag Projectvergunning €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
- s.v.p. uw factuur o.v.v. 'vooruitbetaling' en het bestelnummer 56001154 indienen via e-mail bij [REDACTED], adres:
 Triskelion BV T.a.v Crediteurenadministratie
 Postbus 844, 3700 AV, Zeist
 + Triskelion bestelnummer 56001154

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

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

Naam [REDACTED]
 Functie [REDACTED]
 Plaats Den Haag
 Datum 26 - 06 - 2017
 Handtekening [REDACTED]



Form Project proposal

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

1 General information

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

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Context

Influenza virus is the causative agent of the flu. Each year, influenza virus infects 5-10% of the population causing approximately 3-5 million cases of severe illness and 250,000-300,000 influenza-

related deaths worldwide. In addition to the societal impact, influenza virus infections also have an enormous economic impact: Costs in the United States of America alone are estimated to be 71-167 billion dollar each year (World Health Organization (WHO) Factsheet 2014/2011 Influenza).

These seasonal influenza virus infections have the greatest impact on risk groups, such as elderly and immunocompromised individuals, since their immune response is ineffective in protecting against disease. In contrast, pandemic influenza virus outbreaks affect individuals of all age groups. In the past centuries, at least four pandemics have occurred. The most severe pandemic in history occurred during 1918-1919, when approximately one third of the world's population was infected and an estimated 50 million people died (Taubenberger et al, Emerging infectious diseases 2006). More recently, the 2009 H1N1 pandemic resulted in approximately 250,000 deaths, which mostly affected individuals under 65 years of age (Simonsen et al, PlosMedicine 2013).

Influenza virus composition

Influenza virus can be categorized into three virus subtypes: Influenza A, B and C. Type A can infect both humans and animals such as birds and pigs, and is the primary cause of the influenza epidemics and pandemics. Influenza B virus can only infect humans and is the other cause of seasonal influenza epidemics. Influenza C virus infection mostly occurs in children and causes an infection comparable to the common cold.

Subtyping of influenza A virus occurs based on its surface proteins hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). At the moment, 18 different HA subtypes and 11 different NA subtypes have been described. The combination of the specific HA and NA subtype is used for naming the virus, e.g. H1N1, H3N2, H5N1. The HA and NA proteins continually change due to mistakes (mutations) during replications that are not repaired, this process is called antigenic drift.

Due to the way a virus particle is assembled, viruses of two different subtypes can combine, thereby forming a new subtype. This may occur when one cell is infected with two different virus subtypes, during a process called antigenic shift. These new virus subtypes pose a great threat to society, since there is no immunity present. Another threat is that subtypes circulating in birds, such as H5N1 and H7N9 can infect humans. If these viruses mutate in such a way that they are transmittable between humans, there is a strong possibility that they cause a pandemic.

Immune response to influenza

During a natural influenza infection, both a humoral and a cellular immune response will be induced: The humoral response consists of antibodies, mostly directed to HA, that can neutralize the virus by capturing the virus particle before it infects a cell. The humoral immune response will protect an individual against a new infection for several years, but only if this infection is caused by a virus with a similar HA-subtype. The cellular immune response is mostly directed to the internal proteins (M1, NP) of the virus. Once a cellular response is induced, the immune cells can detect virus-infected cells and can subsequently kill these cells, thereby preventing further spread of the virus.

Treatment methods

Currently, there are two types of therapeutic treatments available that are capable of relieving symptoms of the flu. The most commonly used treatment method inhibits the function of the NA protein, thereby preventing spread of the virus. The other treatment method is based on blocking viral entry. However, influenza viruses have been circulating that are resistant to these treatments, this lack of efficient treatment of patients that are infected with resistant influenza virus can likely result in death. Therefore development of new antiviral drugs against influenza virus is required.

Another strategy is to protect risk groups by vaccination, which is a preventive treatment method. The majority of seasonal vaccines that are currently used induce a humoral immune response against HA and NA proteins. These vaccines are developed based on annual predictions by the WHO which virus subtypes will most likely circulate in the next influenza season. Due to the continually changing HA and NA proteins, these vaccines will not (fully) protect against newly emerging influenza subtypes. In addition, the vaccine needs to be administered annually to ensure protection to the seasonal influenza strains circulating in the subsequent season. Consequently, when a vaccine is not protective against the circulating influenza virus, the only treatment option after infection are antiviral drugs.

Therefore, due to the variable nature of the influenza virus and the emergence of new influenza strains, the development of new strategies to alleviate disease or to prevent infection is required.

Current status

In recent years, a lot of progress has been made in the development of both new treatment methods and vaccines capable of providing broader protection.

For example, combination treatment of a standard antiviral drug with a new treatment method has been described (Dunning et al, *The Lancet Infectious Diseases* 2014; Seo et al, *Antiviral Therapy* 2013). Also potential new viral targets have been described, thereby ensuring that there is a treatment available for individuals infected with resistant strains (as reviewed by Loregian et al, *Cellular and Molecular Life Sciences* 2014).

Universal vaccines:

There also has been great progress in the development of vaccines capable of providing protection against multiple influenza subtypes, both by inducing antibody and T cell responses to conserved parts of the influenza virus.

The primary targets for antibody-driven vaccines are the conserved regions of HA and Matrix 2 protein (M2e). Hereto, several strategies can be applied. In recent years, broadly protecting monoclonal antibodies have been described directed to conserved epitopes of the HA protein (Throsby et al, *PlosOne* 2008; Ekiert et al, *Science* 2009; Dreyfus et al, *Science* 2012; Impagliazzo et al, *Science* 2015). Other options are the use of small proteins, including single or multi domains and peptide-vaccination strategies (Steel et al, *MBio American Society for Microbiology* 2010; Wang et al, *PNAS* 2010). Examples of targets for T cell-inducing vaccination strategies are the internal proteins of influenza virus, such as nucleoprotein (NP) and matrix protein (M). In this regard different strategies, such as immunization with peptides, the use of vectors and RNA-based vaccination strategies are applied (Francis et al, *Vaccine* 2015; Vitelli et al, *PlosOne* 2013; Magini et al, *PlosOne* 2016; Soema et al, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2015).

However, development of vaccination strategies and the development of new types of antiviral drugs are still ongoing and to this end, potential products need to be examined for their immunogenicity and efficacy against a range of influenza virus subtypes.

Although primary screening of these vaccination strategies is often performed *in vitro*, all promising products will continue to be tested in *in vivo* studies as no *in vitro* alternatives are available as it is not possible to directly study the interaction between the immune response, virus and antiviral compound in *in vitro* models. The *in vivo* phase is mostly focussed on route of administration, adjuvants or carriers to be used, optimal dose, administration schedule, possible side effects and efficacy of the product.

This project proposal will aid in the development of new products for the prevention and treatment of influenza virus infection, by allowing examination of these variables. The results of this research will eventually be used for applying the product for approval to the regulatory authorities.

3.2 Purpose

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

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

The main objective of this project proposal is aiding in the development of vaccination strategies and antiviral drugs.

Hereto, animal studies are required to evaluate vaccines or antiviral drugs before they can proceed in the developmental pipeline. We have extensive experience with influenza virus challenge models in mice with a wide range of influenza subtypes, including different subtypes of Influenza A (H1N1, H3N2, H5N1, H7N7, H7N9) and Influenza B models. Animal handling, including clinical observation of the animals in order to score severity of the influenza infection, is performed by fully trained biotechnicians. This results in robust and reproducible models, in which a wide range of vaccines and antiviral drugs can be studied. Our experience makes it possible to determine not only the immunogenicity of vaccines or the mechanism of action of antiviral drugs, but also their efficacy in protecting against a wide range of influenza virus subtypes. In this regard, it may be necessary to develop new influenza virus mouse

challenge models if there is a need to study efficacy of a product against a specific influenza strain. Here, you can think of models against possible new pandemic strains (bird flu), but also models for seasonal influenza strains if considered more relevant than the strains currently available.

3.3 Relevance

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

There are many types of vaccines and antiviral drugs directed against influenza virus infection under development. This project proposal will contribute to the development of new therapeutic options for patients by providing influenza challenge models in which these products can be evaluated. The results of these studies will contribute to the knowledge against which strains these products are effective in vivo. In addition, more information will be provided on the desired route of administration, dosing, treatment schedule, in preparation of the final product to be administered to the patient.

In turn, the information generated by these in vivo studies will contribute to the development of universal influenza vaccines for example, which are designed not only to protect against seasonal influenza virus strains, but also potential pandemic threats. These vaccines will reduce the societal and economic impact of influenza virus by reducing the worldwide number of influenza infections.

Studies in which antiviral therapies are investigated will contribute to effective treatment of hospitalized patients undergoing a severe influenza infection. Recently, influenza strains have been identified which are resistant to standard treatment. New antiviral strategies or combination therapies make it possible to treat individuals more effectively, thereby reducing the number of influenza-related deaths.

3.4 Research strategy

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

Before each study is initiated, the need for an animal study will be evaluated in a project team which may consist of (senior) scientists, biostatisticians and/or pharmacologists. The project team will evaluate the interim results and make recommendations on the number of animals per treatment group, doses used, etc., to maintain the scientific quality of the project. As a contract research organization, most of this work will be performed by the customer. However, in all cases, upon receipt of a study request, a study director (SD, project leader) is appointed, who will form a project team and the project proposal will be discussed scientifically and ethically with the customer. The animal welfare body and the designated veterinarian will be consulted on issues of animal welfare. For most studies a 'pre-study briefing' is performed by the study director to ensure understanding of the study objectives and design by the staff involved. During the study, any adverse effects or other concerns concerning animal welfare will be monitored by the study director and discussed with relevant staff.

When new vaccines or antiviral therapies need to be studied in vivo, a specific influenza challenge model will be selected. We distinguish three types of models: Seasonal influenza A (including H1N1 and H3N2-strains, which are categorized as BSL-2), seasonal influenza B (which are also categorized as BSL-2 strains) and (possible) pandemic strains such as H5N1 and H7N9 (which are categorized as BSL-3).

When a study is planned, the customer together with relevant staff, will use a list of questions to determine which model(s) should be used and how this model should be designed.

- a. Was the immunogenicity and efficacy of the vaccine or antiviral determined in another study in vitro or in vivo? If yes, how are these results translated into the study design? If no, see points b-f.
- b. What is the reason for using an influenza virus challenge model in mice?
- c. Is the target of the vaccine or antiviral specific for a certain influenza subtype? If yes, a model that suits the needs should be used. If no, the objective of the study may determine the correct model, e.g. if the objective is to determine whether the vaccine can be used for bird flu, a model with bird flu should be used.
- d. Can the objective(s) of the study be answered with the study design?
- e. What is the preferred route of administration?*
- f. How is the dose determined?*
- g. How is the treatment schedule determined?*

* This could also be an objective of the study, in that case the results may be used for follow-up studies.

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 different components:

Set-up and validation of new influenza virus models, vaccine immunogenicity and efficacy studies, and prophylactic or therapeutic studies with antivirals.

The general outline of the animal procedures is as follows:

If a new substance needs to be tested, animals will be immunized or will receive prophylactic or therapeutic treatment with an antiviral compound. On 'day 0' of the challenge phase of the study is initiated by intranasal (i.n.) administration with the corresponding influenza virus and bodyweight and clinical signs will be monitored for 14 to 21 days as a measure of severity of disease. During the study, blood samples may be drawn for further analysis. If necessary for other immunological analyses (virology, histology), animals may be sacrificed at an earlier time point to harvest organs.

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.

If the new drug requires assessment of the protective efficacy against a new type of influenza virus, first set-up and validation of the new influenza virus model will be performed. If the required influenza virus model is already available, one of the following may be performed:

Vaccine immunogenicity and efficacy studies:

Animals will be immunized and blood samples will be drawn or organs may be harvested to determine immunogenicity of the vaccine. If possible to combine with analysis of immunogenicity, immunization can be followed with influenza virus challenge to determine efficacy. Depending on both immunogenicity and efficacy of the tested compound, follow-up experiments will be performed.

Prophylactic or therapeutic studies with antivirals:

Animals will be treated with antivirals before challenge with influenza virus prophylactic or animals will be challenged with influenza virus and subsequently treated with antivirals (therapeutic).

These steps depend on the developmental phase of the substance to be tested in the developmental pipeline: Of products that are early in the developmental pipeline, the complete process may be followed of first immunogenicity studies and then challenge studies. Products that are further in the developmental pipeline may be tested directly in challenge studies.

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

Serial number	Type of animal procedure
1	Influenza virus challenge model
2	

3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	50400	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Triskelion B.V.	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	Influenza virus challenge model

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

2 Description of animal procedures

A. Experimental approach and primary outcome parameters

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

The project consists of different components:

Set-up and validation of new influenza virus models, vaccine immunogenicity and efficacy studies, prophylactic or therapeutic studies with antivirals.

The outline of the animal procedures is comparable for these components: In case of development and validation of new influenza virus models, animals will only be challenged with influenza virus, after which body weight and clinical signs will be monitored and animals will be sacrificed at a set time point (see 'challenge phase').

In case of vaccine immunogenicity and efficacy studies or prophylactic/therapeutic studies with antivirals, animals will additionally receive some form of treatment, either before (prophylactic), on the same day, or after virus challenge (therapeutic).

The general design of the animal procedures is as follows:

Treatment phase

Vaccine immunogenicity and efficacy studies:

Animals will receive immunizations on one or more time points before virus challenge. The choice of these time points is made based, for example, on previous experience with the vaccine or a similar type of vaccine or literature on that subject. Generally, two time points will be chosen, two or three weeks apart. Then, approximately two or three weeks after the last immunization, animals will be challenged with influenza virus.

Prophylactic or therapeutic studies with antivirals:

Animals will be immunized or will receive prophylactic or therapeutic treatment with an antiviral compound, which is generally administered at time points closer to the day of challenge, i.e. a few days before or after virus challenge.

For both types of studies: During the pre-infection phase, blood samples may be collected to determine response to the treatment that is administered or (sub)groups of animals may be sacrificed at an earlier time point for immunological analysis of organs, for example.

Challenge phase

All components will have a challenge phase included:

On 'day 0', which is the start of the challenge phase of the study, animals are administered intranasally with the corresponding influenza virus. In addition, clinical signs are monitored each morning (a.m.) and afternoon (p.m.) from the day of challenge onwards until sacrifice. Together with body weight, clinical signs are an important parameter to measure severity of disease. In the morning (a.m. time point) on the day of challenge and the following days until sacrifice, body weight of each animal will be recorded at the a.m. time point. Besides survival, body weight is the primary parameter of influenza virus challenge studies in mice, since the measure of body weight decrease is correlated with the severity of influenza infection, i.e. the larger the body weight decrease, the more severe the infection is. In addition, clinical signs are monitored each morning (a.m.) and afternoon (p.m.) from the day of challenge onwards until sacrifice. Together with body weight, clinical signs are an important parameter to measure severity of disease.

The challenge phase generally lasts 14 or 21 days, after which surviving animals are sacrificed. If necessary for further analysis (virology, histology, immunology), animals may be sacrificed at an earlier time point to isolate organs for further analysis.

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

The animal studies are performed in our American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) certified animal facility. All study procedures will be performed by qualified animal care specialists, which have extensive training in all animal procedures performed in these studies. Procedures are performed according to standard operating procedures (SOPs).

The basis of all type of experiments will be a mouse challenge model, in which survival is the primary read-out, together with body weight and clinical signs as read-out parameters (see 'Challenge phase' for a summary of the procedures).

Set-up and validation studies:

If considered necessary for obtaining the goal of the experiment, new influenza challenge models may be set up. In these set-up and validation studies, the selected influenza virus strain will be assessed for virulence by calculating the 50% Mouse Lethal Dose (MLD₅₀). The MLD₅₀ value calculated from these set-up studies will be used to calculate the required influenza virus challenge dose in all future studies in which that particular influenza virus strain is used. Set-up and validation studies may consist of three steps. If the virulence of the influenza virus strain in mice is known and/or can be obtained from literature, step 1 and 2 are not necessary and we will directly proceed with step 3.

Step 1 (mouse adaptation):

It may be necessary to perform adaptation of the influenza virus strain to mice to ensure that the virus will infect the animal and will induce disease. An example of a virus, which is highly relevant for research, but needs adaptation before it can be used in mice is the H1N1 virus that caused the pandemic in 2009. Mouse adaptation will occur by administration of the 'human' influenza virus to the animal and collection of the virus from the lungs after a few days. The virus will then be isolated from the mouse lung and administered to a naïve mouse. By repeating this process, the influenza virus will adapt so it will survive and replicate in mice. If the animals are susceptible to the adapted influenza virus, the animal will display clinical signs and body weight loss. When this occurs, the virus is considered mouse-

adapted and we can proceed with step 2 (range finding).

Step 2 (range finding):

In step 2, a range finding experiment will be performed in which two groups of four mice will be infected with different dilutions of the virus (the factor between these dilutions may differ between influenza virus strains and is based on literature and/or information provided by the customer).

Step 3 (calculation MLD₅₀):

Based on the results of step 2, or directly if information on the virulence of the influenza virus strain is known, step 3 will be performed to be able to calculate the MLD₅₀ using the Spearman-Kärber method. Therefore, six groups with eight mice per group will be infected with a range of serial dilutions of the virus. Outcome of the study is optimal when the highest dose(s) result in 100% mortality and the lowest dose(s) result in 100% survival.

For vaccine immunogenicity and efficacy studies, and prophylactic or therapeutic studies with antivirals:

Route and frequency of the treatment:

For compounds that are further into development, the route of treatment is generally based on the anticipated human administration route. In addition, the route and frequency of treatment is dependent on physical/chemical properties of the test substance and its bioavailability. For example, for vaccine studies, the frequency of treatment is often based on the anticipated immune response that is required for protection, while for studies with antivirals, the bioavailability of the compound is an important factor. Possible routes of administration are oral, intranasal, intramuscular, intratracheal, intravenous and subcutaneous. A rationale for the chosen route and frequency will be provided for each experiment and communicated to the Animal Welfare Body (AWB). All procedures will meet the criteria described by Diehl et al in 'A good practice guide'.

Blood sampling:

If required, blood samples will be collected from selected groups at certain time points (detailed information will be available in the design). All blood sampling procedures will meet the criteria described by Diehl et al in 'A good practice guide'. Blood samples may be drawn via the tail, retroorbital or mandibular.

If a blood sample is also required at sacrifice (day 14 or day 21 post-challenge), total blood will be collected from all surviving animals during exsanguination from the orbita or via cardiac puncture (under O₂/CO₂ anesthesia).

Collection of organs:

To obtain further information on the mechanism of action of the vaccine or antiviral compound, it may be considered necessary to perform analysis, pre- or post-infection, in different organs including, blood, lungs, spleen, bone marrow and lymph nodes. Examples are measuring the number of infectious particles in a certain organ (e.g. lung viral load), histopathology and the analysis of virus- or compound- specific immune cells. To perform these type of analysis it may be necessary to sacrifice the animals on different time points, before or after influenza virus infection, to collect the organs of interest. When applicable, the rationale will be communicated to the Animal Welfare Body (AWB).

Example study design immunogenicity and efficacy study:

Group	Animals/group	Treatment	Blood sampling	Virus infection	Day of sacrifice*
1-X	8	Days -49, -28	Day -50, -29, -1	Day 0	Day 21
Control group	11	Days -49, -28	Day -50, -29, -1	Day 0	Day 21

Example study design therapeutic antiviral study, which includes a group (Y-Z) for lung viral load:

Group	Animals/group	Virus infection	Treatment	Day of sacrifice*
1-X	10	Day 0	Days 1-6	Day 21

Y-Z	5	Day 0	Days 1-4	Day 5
-----	---	-------	----------	-------

*Of surviving animals

For all studies:

Influenza virus challenge:

In all experiments performed under this protocol, animals will receive a viral challenge with a lethal dose of X MLD₅₀ of the selected influenza strain. Influenza virus will be administered intranasally to anesthetized animals to establish infection not only in the nose, but also in the trachea and lungs. Animals will be anesthetized with an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine and xylazine. Ketamine/xylazine was chosen over isoflurane, since isoflurane has the same route of administration as the virus and the effect of isoflurane anesthesia on influenza virus infection is unknown. Following anesthesia, the animals will receive 50 µL of influenza virus divided in an equal volume per nostril by means of an air displacement pipette. The unconscious animal will be held on its back with its head tilted (nose pointed up) and the animal will be held in this orientation until the complete dose has been breathed down. A new, clean pipette tip will be used for dosing of each animal.

Observation and measurements:

The observation of clinical signs and body weight will be performed as described below:

Pre-challenge:

Clinical observation of the individual animals, to detect reaction to treatment as well as signs of ill-health, moribund or dead animals, will be conducted at least once daily from the day of allocation onwards up to the day of infection.

Post-challenge:

Clinical observation of the individual animals, to detect reaction to treatment as well as signs of ill health, moribund or death, will be conducted twice daily during the daytime within fixed time periods with an intervening time period of at least 5 hours for each animal from day 0 onwards until death or scheduled sacrifice.

An animal will be considered moribund if lethargy is noted in four subsequent observations. If alive at the following observation without a decrease in clinical signs caused by the influenza infection (resulting in a clinical score of 3 or lower, i.e. no sign of recovery), the animal will be killed for ethical reasons.

The following scoring system will be used to grade the severity of influenza infection:

- 0 = no clinical signs;
- 1 = piloerection;
- 2 = piloerection, laboured respiration;
- 3 = piloerection, laboured respiration, hunched posture;
- 4 = piloerection, laboured respiration, hunched posture, lethargic and/or thin;
- 5 = death.

All observations, including the behavioural aspects and any individual abnormality will be recorded and if necessary acted upon by contacting the animal welfare officer/veterinarian.

Body weights:

Pre-infection

Individual body weight measures will be performed in all animals shortly before start of the study (for the purpose of group allocation) and weekly from the start of the study onward or on day -x (prior to dosing) and on day 0 (prior to infection).

Post-infection

Individual body weight measures will be performed once daily in the morning at the same time as the observations for clinical signs from day 0 onwards until death or scheduled sacrifice (day 14 or 21). The weight of the animals that are found dead in the morning will be determined.

Endpoint:

Survival is one of the primary read-outs of these influenza challenge models, as the ability of vaccines or antivirals to prevent death due to influenza infection is an important measure of their efficacy. Both in the early and later stages of the development of vaccines and antivirals, death as an endpoint provides crucial scientific information: If the product can prevent disease, if the product may prevent death, but not disease or if the compound does not have any efficacy at all. Especially to determine whether the latter is true or false, and consequently if the product should proceed further into development or not, death as an end point provides the information necessary to make a sound decision.

Sacrifice:

The surviving animals will be sacrificed on day 14 or 21 by cervical dislocation, via O₂/CO₂ anaesthesia followed by CO₂ asphyxiation or via exsanguination under O₂/CO₂ anaesthesia. The remaining carcasses will be discarded without further investigations (unless indicated differently in the provided information about the study design).

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

The total number of animals per experiment may vary and is dependent on the number of groups and of the group size. The number of groups per experiment depends on the objective of that experiment. The group size will be calculated for each experiment using a power analysis. Historical data can be used to perform the sample size calculation and to determine the number of groups necessary.

Group size for set-up and validation studies as described above, step 2 and 3 are set, based on sample size calculation needed to determine the right range (hereby taking individual variation of the animals into account) or to calculate the MLD₅₀.

B. The animals

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

Mice are used in our models for influenza virus infection. Mice were chosen since they are a suitable model for influenza virus and there is a wide range of reagents available for analysis of a wide array of analyses. The wide range of reagents available for mice enables analysis of not only the efficacy of the vaccines or antiviral compounds, but also of the mechanism of action of these compounds. In addition, mice show consistent disease manifestations due to similarity in their genetic background.

The influenza virus challenge models we have available are set up in young adult female BALB/c mice and one strain was set up with young adult female 129S2/Sv mice.

In the type of studies that we perform (mostly preclinical studies), female mice are preferred since they have greater humoral and cell-mediated immune responses to vaccination, or other antigenic stimulation, and are more sensitive to influenza virus infection (Klein et al, Journal of leukocyte biology 2012; Lorenzo et al, Vaccine 2011). If we would test a vaccine for example, a smaller number of animals is needed if female mice are used, since females both respond better to vaccination (higher antibody titers) and are more sensitive to infection. Since survival is used as a read-out in these challenge models, less sensitivity to influenza infection (e.g. by male mice) would lead to a greater number of animals needed to draw conclusions on the efficacy of the vaccine or antiviral compound. The same holds true for the use of a different mouse strain, since each strain exhibits different weight loss kinetics and survival rates after infection with the same influenza virus strain (Srivastava et al, PlosOne 2009).

Therefore, if an influenza virus challenge model is set-up with a particular mouse strain and sex, the same strain and sex should always be used for analysis with that particular influenza virus strain to maintain a robust model for analysis of the effect of the vaccine or antiviral compound.

Group size of vaccine immunogenicity and efficacy studies, prophylactic studies with antivirals and therapeutic studies with antivirals varies and depends mostly on (expected) efficacy of treatment and consequently the variation within and between groups:

Generally, a group size of 10 animals per group is used in studies which survival, body weight and clinical observations are the primary read-outs. However, a power analysis is performed for each study: If a larger variation is expected, a larger group size for the control or treatment groups may be necessary to

be able to answer the research question. If a very small variation is expected, a smaller group size may be sufficient.

For immunogenicity groups, often, a group size of approximately 5 animals is used. In these groups of the study, ex vivo read-outs are used to calculate the exact group size. For example, if antibody titers are the primary read-out, group size is determined based on the variation of the antibody titer within and between groups.

To determine lung viral load titers, often a group size of 5-6 animals is sufficient to be able to calculate a significant difference between treatment groups and the control groups. However, also in this case, the exact group size needed depends on the expected difference between treatment and control groups and on the variation within a group.

In all cases a power analysis will be performed for each study, which will be communicated to and discussed with the AWB.

Based on 15 studies per year with 120 animals per study (approximately 12 groups), we expect a total number of $1800 \times 5 = 9000$ mice is needed over a period of five years.

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: Before each study is initiated, historical data will be considered and the question will be asked whether an animal study is necessary or if additional in vitro assays need to be performed.

Reduction: Before each study is initiated, detailed information will be gathered to determine the suitable influenza virus challenge model. For each experiment, a power analysis will be performed to calculate the number of animals needed per group and a scientific backing for the number of groups will be requested from the customer. This includes questioning whether the required control groups are included or if control groups can be excluded based on historical data, for example.

Refinement: Clinical signs, not only in the post-infection phase, but also in the pre-infection phase will be carefully monitored to be able to act when necessary. During the post-infection phase, the animals will be scored individual, twice daily. Animal caretakers, especially trained for scoring signs during influenza infection, will register these recorded clinical signs as listed under K. If the signs are observed, immediate actions will be taken to decrease the suffering, pain or discomfort. If needed the humane endpoints will be used.

After infection, the animals will receive a cup of hydrogel and feed pellets at the bottom of the cage to facilitate the access to feed and drinking water during the course of infection. Animals will be group-housed in macrolon cages provided with wood shavings (Lignocel) as bedding material and a piece of gnaw wood (Aspen) and shreds of paper (Enviro-dri) or a SMART home as environmental enrichment.

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

Animal suffering

Animal suffering is diminished by carefully monitoring the animals and by taking the humane endpoint during influenza virus infection into account. For all animal procedures, the guidelines of "Code of Practice" of Diehl are followed.

Environment

For research with Genetically Modified Organism (GMO) (for example viral vectors), our facility meets the requirements up to ML-II, DM-II and DM-III.

Repetition and duplication

E. Repetition

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

Not applicable.

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

Anesthesia will only be performed if considered necessary for the animal procedures, but not to prevent pain or stress, since this is in contradiction with the main read-out of the influenza virus challenge models, in which survival, body weight loss and clinical observations are the primary read-outs. Consequently, using above mentioned methods are irreconcilable with the study design.

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?

No other adverse effects on the animals' welfare may be expected other than those arising from the procedures described in the protocol.

Explain why these effects may emerge.

Not applicable

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

If unexpected adverse effects of the test substance, for example, arise the study director (article 9) will be informed immediately. Where possible, actions will be taken to minimise severity or prevent occurrence during follow-up experiments. For example by changing the dose of administration or by taking other actions to relieve adverse effects.

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.

Since survival is the primary read-out for these influenza virus challenge models, the use of humane endpoints will be monitored very carefully. The following humane endpoints will be used:
If an animal has shown lethargy in four previous occasions (clinical observations are performed on the a.m. and p.m. time point), the animal will be sacrificed. In addition, if animals show unexpected severe levels of discomfort, which are not related to influenza infection, the animals will be sacrificed to minimize discomfort for that animal.

Indicate the likely incidence.

In the majority of cases, animals will experience a relatively short period of disease, after which animals will or will not survive infection. If lethargy occurs is largely dependent on the efficacy of treatment, since it mostly occurs when animals have received a suboptimal vaccine or antiviral. This is estimated to occur in maybe one out of three experiments, in which a few animals show lethargy.
The occurrence of unexpected severe discomfort are incidental at most.

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').

Depending on the animal procedures (e.g. frequency, route and duration of treatment or other animal procedures), the allowed cumulative discomfort will be 'mild' or 'moderate'.

The scoring system described below is used to indicate the levels of discomfort of influenza infection:

0 = no clinical signs;

1 = piloerection;

2 = piloerection, laboured respiration;

3 = piloerection, laboured respiration, hunched posture;

4 = piloerection, laboured respiration, hunched posture, lethargic and/or thin;

5 = death

Scores '0' and '1' are categorized as 'mild'; scores '2' and '3' as 'moderate' and score '4' as 'severe' influenza infection.

Based on historical data, we expect that approximately one quarter of the animals will have a 'severe' infection, more than half of the animals will have a 'moderate' infection and the rest of the animals will have a 'mild' infection. Of the animals experiencing moderate or severe infection we expect that approximately half of the animals will not recover, i.e. will not survive influenza infection. Animals experiencing 'mild' infection will generally all recover from infection.

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.

Since the animals went through an influenza virus infection, they may not be used after the experiment. In addition animals may be killed for the collection of tissues/blood or for ethical reasons, i.e. reaching humane endpoint.

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 :

2. Titel van het project: Research for the development of products to treat and prevent influenza virus infection.

3. Titel van de NTS : Onderzoek voor de ontwikkeling van producten ter behandeling van en bescherming tegen griep.

4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
 wijziging van vergunning met nummer :

5. Contactgegevens DEC

Naam DEC: DEC TNO

Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]

E-mailadres contactpersoon: [REDACTED]

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

- ontvangen door DEC: 05-04-2017
 aanvraag compleet: 05-05-2017
 in vergadering besproken: 12-04-2017
 anderszins behandeld: e-mail-discussie door DEC-leden tussen 12-05-2017 en 23-05-2017
 termijnonderbreking(en) van / tot : van 18-04-2017 tot 12-05-2017
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
 aanpassing aanvraag: 12-05-2017
 advies aan CCD: 26-05-2017

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

8. Eventueel horen van aanvrager

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

9. Correspondentie met de aanvrager

- Datum vragen: 18-4-2017
- Datum antwoord: 12-5-2017
- Gestelde vragen en antwoorden: zie hierna
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

Vragen bij projectvoorstel "Research for the development of products to treat and prevent influenza virus infection"

1. De belangrijkste discussie die wij als DEC hebben over deze projectaanvraag is het eindpunt van de studies: de dood. In het verleden hebben we hier uitgebreid met u over gediscussieerd, en toen heeft u ons duidelijk gemaakt dat er geen andere echt goede voorspellende parameters en daarmee geen scherpere humane eindpunten voor dit type studies. Destijds hebben we daar ook een onafhankelijke expert voor geraadpleegd. Nu hebben wij hierover opnieuw 2 vragen.
 - a. Wat zijn de ontwikkelingen in dit soort studies van de afgelopen jaren? Wordt er door u of door collega's in uw vakgebied toegewerkt naar alternatieve parameters?

Er wordt relatief weinig gepubliceerd over goede voorspellende parameters voor influenza infectie in muizen en de consensus over de humane eindpunten is dan op dit moment ook niet anders dan bij de vorige projectaanvraag. Wel hebben wij intensief contact met andere groepen die vergelijkbare experimenten uitvoeren, waarin wij onder andere ethische overwegingen, inclusief de humane eindpunten bespreken. Ook hebben wij onlangs, samen met het uitvoerend personeel, een bijeenkomst gehad waarin er nogmaals gekeken is naar de methode van scoren van influenza infectie in muizen en, daarmee samenhangend, het bepalen van humane eindpunten in deze experimenten. Deze bijeenkomst wordt regelmatig gehouden om ervoor te zorgen dat iedereen goed op de hoogte is en om iedereen scherp te houden op de gemaakte afspraken. Daarnaast zijn we als Triskelion bezig met het oprichten van een werkgroep waarin specifiek gekeken wordt naar de huidige humane eindpunten en naar methoden om deze uiteindelijk op een objectieve manier aan te kunnen scherpen. Uiteindelijk zouden we hierbij een biostatisticus willen aanhaken die daaraan kan bijdragen door een gedegen onderbouwing aan te leveren op basis van historische data.

- b. Kunt u specifiek uitweiden over de noodzaak van de dood als eindpunt voor studies in een meer verkennende fase van de ontwikkeling versus het gebruik van vroegere parameters.

Voor alle fasen van de ontwikkeling van een vaccin of antiviraal middel geldt dat de informatie die gehaald kan worden uit dood als eindpunt cruciaal is voor de ontwikkeling van het vaccin of antiviraal middel: Het blijft wetenschappelijk gezien belangrijk om te weten of een middel echt niet werkt (d.w.z. de dieren ondanks behandeling overlijden aan influenza infectie) of dat het middel wel dood kan voorkomen maar niet ziekte. In het geval van de ontwikkeling van bijv. een vaccin tegen de vogelgriep is dit wat meer vanzelfsprekend, aangezien ook een vaccin die dood door vogelgriep kan voorkomen relevant is. Maar hetzelfde geldt voor de ontwikkeling van een antiviraal middel of vaccin tegen seizoensale influenza virussen: In het geval dat dit middel nog enigszins beschermt kan het de moeite waard zijn om het middel verder door te ontwikkelen zodat het uiteindelijk wel beschermt, bijvoorbeeld door andere adjuvans, dosis of frequentie van toediening te testen. Werkt het middel echter helemaal niet, dan zal de keuze eerder gemaakt kunnen worden om te stoppen met de ontwikkeling van het vaccin of antiviraal middel. Door de dood als eindpunt aan te houden zal er dus beter een keuze gemaakt kunnen worden om wel of niet door te gaan met de ontwikkeling van het product.

Deze keuze heb ik nader toegelicht in de Appendix onder 'Describe the proposed animal procedures...', kopje end point.

2. In 3.2 geeft u aan wat het doel is van het onderzoeksproject. Hier missen we een korte toelichting bij de haalbaarheid van het doel: waarom is het juist uw onderzoeksgroep die dit onderzoek zou moeten doen? Kunt u informatie geven over de kwaliteiten en successen van de onderzoeksgroep en uw werk van de afgelopen jaren? Is de gekozen strategie (op basis van het verleden) er een die ook daadwerkelijk datgene oplevert wat u beoogt?

De afgelopen jaren heeft Triskelion veel ervaring opgebouwd in het uitvoeren van influenza virus challenge proeven met verschillende influenza virussen en voor verschillende behandelingen. Deze ervaring heeft geresulteerd in robuuste modellen, d.w.z. dat we een goede voorspelling kunnen maken hoe een model verloopt en daardoor gedegen advies kunnen geven over het meest geschikte model benodigd voor het beantwoorden van het doel van het experiment.

Deze ervaring heeft tot nu toe bijgedragen aan het opbouwen van langlopende samenwerkingen waarbij we gedurende het ontwikkelingstraject van o.a. vaccins in verschillende fasen van het traject experimenten hebben uitgevoerd. Een aantal van deze samenwerkingen staan beschreven in onderstaande publicaties, waarin Triskelion ook genoemd wordt:

- Cox 2015 Virology Journal Matrix-M adjuvation broadens protection induced by seasonal trivalent virosomal influenza vaccine
- Roozendaal 2015 Vaccines & Vaccination H5N1 protection by seasonal influenza vaccine in homologous and heterologous prime/boost vaccination
- Impagliazzo 2015, Science, A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen.

Daarnaast worden momenteel twee manuscripten geschreven die voortkomen uit een langdurige samenwerking op het gebied van de ontwikkeling van o.a. een antiviraal middel. Deze publicaties dragen uiteraard bij aan het delen van kennis en zullen daarnaast bijdragen aan de (verdere) ontwikkeling van producten ter voorkoming en bescherming van griep. Deze informatie heb ik toegevoegd aan de general description, in 3.2.

3. In de bijlage onder B, The animals, is sprake van "young adult females". Kunt u hierbij iets meer vertellen over de transleerbaarheid naar menselijke mannen en ouderen?

Tijdens de fase van het onderzoek waarin wij de experimenten uitvoeren, is de belangrijkste vraag gericht op het werkingsmechanisme van het vaccin of het antivirale middel. Hierbij is het met name belangrijk om te kiezen voor het model

(seks) waarin het effect van de behandeling het grootste is en de spreiding het kleinste. De keuze voor 'young adult females' is dan ook voornamelijk gebaseerd op het feit dat vrouwelijke muizen gevoeliger zijn voor influenza infectie dan mannelijke muizen. Vrouwen (zowel muizen als mensen) hebben een sterkere humorale immuunrespons, zoals onder andere beschreven voor influenza vaccinatie, waardoor zij met een lagere dosis beschermd zullen zijn tegen influenza virus infectie (Klein 2010, the Lancet Infectious diseases). De eerste experimenten (klinische trials) voor het bepalen van de uiteindelijke dosis in mensen worden echter vaak uitgevoerd in mannen. Dit is ook het moment waarop de transleerbaarheid naar mensen in het algemeen wordt getest. Daarnaast wordt, indien noodzakelijk, voor het gebruik van een vaccin of antiviraal middel in ouderen nog verder onderzoek verricht (dit kan zowel pre-klinisch als klinisch zijn), maar valt buiten de doelstellingen beschreven in deze projectaanvraag.

4. Een deel van het ongerief bij de proefdieren komt voort uit het feit dat zij ziek worden van het influenzavirus en eraan komen te overlijden. Dieren met lichtere verschijnselen blijven relatief lang in leven (Bijlage, D en J). Om hier meer duidelijkheid over te krijgen willen u bovendien verzoeken om de wijze van monitoren (Bijlage, D, Refinement) nog wat te preciseren.

De dieren worden vanaf de dag van influenza infectie twee keer per dag gemonitord op klinische verschijnselen, waarbij iedere ochtend ook het lichaamsgewicht wordt genoteerd. Er wordt hierbij ervoor gezorgd dat er een minimale periode tussen de twee scorings momenten zit om een zo goed mogelijk beeld te krijgen. Wij hanteren het volgende scoringsstelsel voor influenza infectie modellen:

0 = no clinical signs;

1 = piloerection;

2 = piloerection, laboured respiration;

3 = piloerection, laboured respiration, hunched posture;

4 = piloerection, laboured respiration, hunched posture, lethargic and/or thin;

5 = death.

Deze observaties worden per individueel dier ingevoerd door ervaren biotechnici, die specifiek getraind zijn in het scoren van signs bij influenza infectie. De study director houdt deze signs in de gaten en daarnaast zullen de biotechnici zelf bij afwijkende observaties (bijvoorbeeld een dier dat langdurig ziek blijft en qua lichaamsgewicht niet aankomt) de study director waarschuwen. Er zal dan worden gekeken of het dier uit ethische overwegingen eerder opgeofferd kan worden of dat er andere maatregelen genomen kunnen worden om het lijden tot een minimum te beperken.

5. In de NTS, die overigens duidelijk geschreven is, vragen we ons af of bij 3.4 de formulering "waardoor de dieren zich niet lekker zullen voelen en minder eetlust zullen krijgen" recht doet aan de mate van ongerief zoals beschreven in de bijlage en aan het feit dat een deel van de dieren aan de verschijnselen van het influenzavirus zal overlijden.

Ik ben het ermee eens dat deze zin niet geheel duidelijk is over de mate van ongerief en heb deze gespecificeerd door de zin te veranderen in: 'waardoor de dieren griepverschijnselen zullen ontwikkelen, wat zich onder andere uit in dat de dieren zichzelf minder goed verzorgen en in gewichtsverlies door verminderde eetlust'.

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

- Aard expertise 1: voorzitter van een andere DEC
- Deskundigheid expert: proefdierdeskundige met ervaring met het maken van afwegingen inzake influenzamodelen
- Datum verzoek: 16-5-2017
- Strekking van het verzoek: Wij hebben in het verleden uitgebreid met onderzoekers gesproken over de juiste parameter (de dood als eindpunt), om de effectiviteit van een behandeling tegen Influenza te bepalen. Nu ligt een dergelijke aanvraag opnieuw voor en willen we graag verifiëren of er inmiddels ontwikkelingen zijn met betrekking tot de juiste parameter en advies hoe u aankijkt tegen het combineren van dit eindpunt met een humaan eindpunt.
- Datum expertadvies: 16-5-2017
- Advies expert: Er is op dit moment nog geen andere voorspellende waarde te vinden voor de effectiviteit van een behandeling. Het streven zou zijn om te werken naar een betere voorspeller voor de immunogeniciteit van een behandeling. Helaas is deze voorspeller nog niet beschikbaar. Met ieder ander eerder eindpunt (en de vergunninghouders waar ik mee te maken heb gehad zijn hier intensief mee bezig) zal het zo zijn dat een behandeling mogelijk ten onrechte uit de ontwikkeling wordt gehaald.

- Aard expertise 2: Hoogleraar alternatieven voor dierproeven
- Deskundigheid expert: proefdierkunde, toegepaste immunologie
- Datum verzoek: 24-4-2017
- Strekking van het verzoek: een jaar of 2 geleden ben ik bij je langs geweest om je expertise te vragen met betrekking tot influenzastudies in muizen. Nu ligt er opnieuw een projectvoorstel bij onze DEC en wij willen graag even bij jou verifiëren of er inmiddels ontwikkelingen zijn met betrekking tot de juiste parameter. Opnieuw wordt de dood als eindpunt aangevoerd en het feit dat andere parameters niet voldoende informatie geven over de werkzaamheid van een vaccin. Kun je ons adviseren over de wetenschappelijke of wettelijke noodzaak voor dit meetpunt (dood) en hoe het staat met de ontwikkelingen op dit gebied?
- Datum expertadvies: 21-5-2017
- Advies expert: Dieren zouden gedood dienen te worden bij ernstige klinische verschijnselen. Bij influenza zal dat lethargie zijn, gewichtsverlies, ademhalingsproblemen (bijvoorbeeld pompemde ademhaling), sociale isolatie. Ik zou als DEC eisen dat de verantwoordelijk onderzoeker humane eindpunten benoemt. Deze moeten dan wel goed gedefinieerd worden en door de observanten eenduidig worden afgelezen.

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

C. Beoordeling (inhoud):

1. De aanvraag is toetsbaar en heeft voldoende samenhang. Het gaat om experimenten rond de evaluatie van influenzavaccins, met een duidelijke strategie en opzet. De leden van DEC TNO onderschrijven allemaal het belang van het testen van producten om influenza te behandelen en te voorkomen. DEC TNO heeft in een vergadering aangaande dit project, maar ook in eerdere vergaderingen met aanvragen rond dit thema, uitgebreid gediscussieerd over de gebruikte strategie van dit type experimenten. In de voorliggende projectaanvraag zien wij de samenhang in de type experimenten die zullen vallen binnen deze projectaanvraag. En door de strategie die is beschreven in 3.4.1 is DEC TNO ervan overtuigd dat enkel en alleen producten met als doel het voorkomen of het behandelen van influenza worden getest in de beschreven experimenten. Daarbij zien wij dat, door de verschillende subtypen van de influenzastam op te nemen in één aanvraag, de aanvrager het mogelijk heeft gemaakt om met de experimenten beschreven in dit project, ook producten met een brede beschermingspotentie te evalueren .

2. Voor zover de DEC bekend, is er geen mogelijk tegenstrijdige wetgeving die het uitvoeren van de dierexperimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) sluit(en) aan bij de hoofddoelstelling(en). De hoofddoelstelling is volledig gericht op translationeel onderzoek. De experimenten zoals beschreven hebben altijd als doel om producten te ontwikkelen die transleerbaar zijn voor humaan gebruik. Daarbij is ook in het antwoord op vraag 3 aangegeven dat deze experimenten zich bevinden in de vroege fase van ontwikkeling en dat de transleerbaarheid naar de eigenlijke gebruikers van deze producten in een later stadium wordt onderzocht.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is bijdragen aan de ontwikkeling van vaccinatiestrategieën en antivirale medicijnen tegen verschillende vormen van influenza. Het uiteindelijke doel van het project is het verminderen van de bedreigingen die influenzavirussen vormen voor gezondheid en welzijn. DEC TNO 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: toekomstige influenzapatiënten en de proefdieren die erbij betrokken zijn, namelijk muizen. Daarnaast is de samenleving als geheel belanghebbende: bij influenzapandemieën kan kunnen gehele samenlevingen ontwricht raken. Uiteraard zijn de onderzoekers ook belanghebbende, maar hun belang is relatief klein. De opdrachtgevers voor dit soort studies zijn ook belanghebbende omdat zij belang hebben bij informatie over hun product om het vervolgens te kunnen verzilveren. Dit is een reëel belang, af te leiden aan het feit dat deze partijen investeren in dit type dierproeven. Voor de patiënten zijn in het geding: leven, gezondheid, welzijn, activiteiten kunnen ontplooiën. De morele waarden die voor de proefdieren in het geding zijn, zijn: leven, gezondheid en welzijn. Voor de samenleving gaat het om het de veiligheid met betrekking tot de dreiging van influenzavirussen en het welzijn van de bevolking.
6. DEC TNO ziet geen aanleiding om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken en onderschrijft dat de genoemde beveiligingsniveaus voor het werken met dit soort virussen geschikt zijn om het milieu te beschermen

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd en dragen eraan bij dat de doelstellingen behaald kunnen worden, dat aan de 3V-beginselen voldaan kan worden en dat voorkomen kan worden dat mens, dier en milieu negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven. De haalbaarheid wordt uitgebreid beargumenteerd in het antwoord op vraag 2. DEC TNO heeft uitgebreid gediscussieerd over het verfijnen van de studies binnen dit project. Wij hebben daar ook vragen over gesteld aan de onderzoeker. In het antwoorden op vraag 1a zien wij de moeite die deze

onderzoeker steekt in het kritisch kijken naar eigen modellen. Daarbij wordt een interne strategie beschreven met betrekking tot kennisoverdracht en discussie, en tevens een werkgroep, waarbij ook biostatistische expertise wordt ingewonnen. Daarmee borgt een onderzoeker steeds te werken aan mogelijke verfijningen in dit project op het gebied van de dood als eindpunt.

8. Het project is goed opgezet, de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten logisch en helder aan bij de aangegeven doelstellingen en de gekozen strategie en experimentele aanpak kan leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. DEC TNO heeft zeer uitgebreid gesproken over de voorgestelde experimentele opzet en in het bijzonder over de belangrijkste uitkomstparameter die opgevoerd wordt in de experimenten: de dood als eindpunt. Wij zijn ervan overtuigd dat informatie over het overleven van dieren een geschikte parameter is om de onderzoeksvragen binnen dit project te kunnen beantwoorden. Wij hebben als commissie wel de vraag gesteld of deze parameter niet vervangen zou kunnen worden door een voorspeller van de dood. Deze vraag hebben wij als commissie een aantal jaar geleden (destijds nog voor een DEC-aanvraag) ook gesteld aan de onderzoeker. Dit heeft toen geleid tot een uitgebreide uitleg en discussie tussen de onderzoeker en DEC TNO. Ditmaal hebben we opnieuw deze vraag gesteld aan de onderzoeker (1b) met daarbij specifiek de vraag of deze parameter ook in de vroege ontwikkelfase zo cruciaal is. De onderzoekers hebben deze vraag beantwoord, deze informatie in de appendix verwerkt en ook nog geïllustreerd met een aantal artikelen. De antwoorden van de experts onderschrijven de moeite die DEC TNO heeft met dit eindpunt, en hebben ertoe geleid dat, hoewel DEC TNO akkoord gaat met deze parameter, de noodzaak van verfijning met betrekking tot deze parameter niet meer kan worden genegeerd. DEC TNO doet dan ook de suggestie voor een voorwaarde die ertoe zal leiden dat in een jaarlijkse retrospectieve analyse, de Instantie voor Dierenwelzijn, de CCD en de op dat moment beoordelende ethische commissie, de noodzaak van deze parameter objectief kunnen beoordelen. Ook adviseert DEC TNO een gemotiveerde afstemming met de Instantie voor Dierenwelzijn per experiment voor het toepassen van de dood als eindpunt, gerelateerd aan de fase van ontwikkeling of de mogelijke toepassing van het product.

Welzijn dieren

9. Er is geen sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:
- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
 - Niet-menselijke primaten (10e)
 - Dieren in/uit het wild (10f)
 - Niet gefokt voor dierproeven (11, bijlage I EU richtlijn)
 - Zwerfdieren (10h)
 - Hergebruik (1e lid 2)
 - Locatie: buiten instelling vergunninghouder (10g)
 - Geen toepassing verdoving/pijnbestrijding (13)

Dodingsmethode niet volgens bijlage IV EU richtlijn (13c lid 3)

10. De dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van de EU-richtlijn.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief is door de onderzoeker ingeschat als licht tot ernstig, waarbij de handelingen ingeschat worden als licht tot matig en het ondergaan van een influenza-infectie van licht tot ernstig. In het scoringssysteem voor het inschatten van het ongerief van een influenza-infectie, dat naar aanleiding van vraag 4 in de aanvraag is opgenomen, is expliciet weergegeven welke symptomen van de influenza-infectie tot een bepaalde inschatting van het ongerief leiden. Dit is naar de mening van de commissie goed geclassificeerd. De handelingen zijn expliciet uitgeschreven in A van de aanvraag, en DEC TNO kan zich vinden in het inschatten van het cumulatief ongerief op basis van de handelingen die per experiment gecombineerd zullen worden. Daarbij kan DEC TNO zich vinden in de verdeling in percentages van het ongerief zoals omschreven in de NTS.
12. De integriteit van de dieren wordt aangetast in die zin dat ze als proefdier worden gebruikt en worden gedood. Er is geen andere aantasting van de integriteit van het dier.
13. De humane eindpunten zijn in de bijlage goed gedefinieerd en het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt bereikt is goed ingeschat. De discussie in de DEC TNO heeft zich voornamelijk toegespitst op de noodzaak van de dood als humaan eindpunt en het ongerief daar daarbij komt kijken. De argumentatie van de aanvrager m.b.t. tot de noodzaak hiervan heeft de commissie, na consultatie van experts, als bevredigend beoordeeld. Zie hiervoor ook de vragen A9 en A10.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. In onderdeel 3.1 van de aanvraag beargumenteert de aanvrager dat er na een primaire screening in vitro altijd wordt overgegaan op een in vivo screening. Deze in vivo stap is noodzakelijk omdat de interactie tussen het immuunsysteem, het virus en het antivirale middel niet in vitro kan worden onderzocht. Daarbij ligt de focus van de in vivo fase juist ook op de toedieningsroute, adjuvantia en dergelijke, de dosering, bijwerkingen en effectiviteit van een antivirale strategie. DEC TNO is ervan overtuigd dat hier inderdaad nog dierstudies voor nodig zijn.
15. Het aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en er is een heldere strategie om ervoor te zorgen dat tijdens het project met zo min mogelijk dieren wordt gewerkt waarmee een betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Deze bestaat onder andere uit een poweranalyse per experiment en een analyse van mogelijkheden tot reductie ten opzichte van het door de klant gevraagde aantal.

16. DEC TNO heeft uitgebreid gesproken over verfijning. We hebben deze discussie beschreven bij vraag 7 en 8. De conclusie is dat het project in de ogen van DEC TNO wel in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De onderzoekers geven aan actief op zoek te zijn naar alternatieve parameters om te gebruiken in plaats van de dood als eindpunt. DEC TNO is wel van mening dat hier echt steeds aandacht voor moet zijn en heeft derhalve een voorwaarde geformuleerd bij dit project. Los van deze discussie beschrijven de onderzoekers dat zij gebruik maken van de richtlijnen zoals beschreven door Diehl en collega's. De onderzoekers beschrijven de monitoringsfrequentie voor zieke dieren en de maatregelen die zij nemen om het ondergaan van een influenza infectie door een muis waar mogelijk te verzachten door voer en water in de kooi aan te bieden.
17. Er is geen sprake van wettelijk vereist onderzoek. Maar indien een dossier wordt gemaakt zullen de experimenten wel onderdeel kunnen vormen van een regulatorisch dossier.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Er zullen in bijlage 1 alleen vrouwelijke dieren gebruikt worden. De aanvrager heeft dit in voldoende mate wetenschappelijk onderbouwd. De reden is dat vrouwelijke muizen sterker reageren op influenza en daardoor de kenmerken duidelijker tonen. DEC TNO is ervan overtuigd dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het, om de doelstellingen te bereiken, noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijk dieren uit te voeren. Hiermee voorkomen zij dat er niet meer dieren gebruikt worden dan strikt noodzakelijk in experimenten die ook ernstig ongerief kunnen veroorzaken. DEC TNO heeft de aanvrager tevens bevraagd op de leeftijd van de dieren, en DEC TNO vindt het in het stadium van de ontwikkeling van een vaccin verantwoord dat het diermodel niet een best mogelijke weergave is van de humane populatie die baat heeft bij deze middelen (ouderen), maar dat de modellen gekozen worden die zo veel mogelijk informatie geven over de werking van de middelen in relatie tot het virus en de immuunrespons.
19. De dieren worden in het kader van het project gedood. Door de besmetting met influenza kunnen zij niet opnieuw gebruikt worden. Organen zullen in sommige gevallen worden onderzocht ten behoeve van de experimenten. De dieren worden gedood volgens bijlage IV van de EU-richtlijn.
20. Omdat in het projectvoorstel specifieke muizen worden aangevraagd, zullen naïeve dieren die nodig zijn voor dit soort experimenten niet beschikbaar zijn. Derhalve is de vraag over hergebruik hier in de ogen van DEC TNO niet van toepassing.

NTS

21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en is begrijpelijk geformuleerd. De commissie heeft een vraag gesteld over de weergave van het ongerief in de

NTS en daarop heeft de aanvrager een aanpassing gemaakt in de NTS, naar tevredenheid van de commissie.

D. Ethische afweging

1. De centrale morele vraag luidt: rechtvaardigt het verbeteren van vaccins voor verschillende typen influenza het ongerief (alle categorieën komen voor) van 9.000 muizen?
2. De waarden die in het geding zijn voor de patiënten, de samenleving en de dieren, zijn alle zeer groot. Influenza kan veel problemen geven op het gebied van welzijn en functioneren, tot en met de dood als gevolg en potentiële ontwrichting van de samenleving bij een pandemie. Bij de experimenten komt veel ongerief kijken voor een groot aantal dieren, met name ook door de dood als eindpunt. Daarom was het voor de commissie een moeilijke afweging.
3. De commissie is van mening dat het belang van de patiënten en de samenleving als geheel zwaarder weegt dan het belang van de proefdieren. Influenza brengt veel negatieve gevolgen met zich mee, van ongemak tot en met de dood en ontwrichting van de samenleving. Door de besmettelijkheid kunnen zich pandemieën voordoen. Het is aannemelijk dat het onderzoek binnen dit project kan bijdragen aan het voorkomen of verminderen van een aantal negatieve effecten van influenza. Hoewel het ongerief voor een groot aantal proefdieren zich (mede) in de hogere categorieën bevindt, weegt het belang van de samenleving en de patiënten zwaarder. Het belang van het onderzoek is groot, en het is aannemelijk, door de opzet en strategie van het project en de deskundigheid van de uitvoerenden, dat er een substantiële bijdrage kan worden gedaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD
 DEC TNO adviseert de vergunning te verlenen.

X DEC TNO adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden.

Aangezien deze experimenten ook ernstig ongerief betreffen zal er een retrospectieve analyse gedaan moeten worden. DEC TNO zou als voorwaarde willen stellen dat gedurende het gehele project jaarlijks, per experiment, een analyse wordt gemaakt met betrekking tot de vraag of striktere humane eindpunten tot een andere uitkomst zouden hebben geleid. Daarbij zou de ethische commissie per experiment expliciet willen kunnen beoordelen of het aan- of afwezig zijn van lethargie, gewichtsverlies, ademhalingsproblemen (bijvoorbeeld pompemde ademhaling) en sociale isolatie van invloed zou kunnen zijn geweest op de uiteindelijke overall conclusie.

Aangezien DEC TNO ervan overtuigd is dat de dood als eindpunt in deze experimenten meestal nodig is, maar misschien niet altijd, zouden wij de voorwaarde willen stellen van een

gemotiveerde afstemming met de Instantie voor Dierenwelzijn per experiment voor het toepassen van de dood als eindpunt. Dit gerelateerd aan de fase van ontwikkeling of de mogelijke toepassing van het product.

DEC TNO adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn dilemma's naar voren gekomen met betrekking tot de dood als eindpunt voor deze proeven. Deze hebben wij uitgebreid beschreven in het bovenstaande advies.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Triskelion BV

[REDACTED]

Postbus 844

3704 HE ZEIST



**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
AVD5040020171964

Bijlagen

2

Datum 1 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 31 mei 2017. Het gaat om uw project "Research for the development of products to treat and prevent influenza virus infection.". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD5040020171964. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

1 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD5040020171964






Datum:
1 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD5040020171964

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 50400
Naam instelling of organisatie: Triskelion BV
Naam portefeuillehouder of
diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 51382997
Postbus: 844
Postcode en plaats: 3704 HE ZEIST
IBAN: NL101NGB0654470189
Tenaamstelling van het
rekeningnummer: Triskelion B.V.

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
1 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD5040020171964

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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



Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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

Over uw project

Geplande startdatum:

1 januari 2018

Geplande einddatum:

1 januari 2023

Titel project:

Research for the development of products to treat and prevent influenza virus infection.

Titel niet-technische samenvatting:

Onderzoek voor de ontwikkeling van producten ter behandeling van en bescherming tegen griep.

Naam DEC:

DEC-TNO

Postadres DEC:

96800 2509 JE DEN HAAG

E-mailadres DEC:



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:

Functie:

Plaats:

Datum:



Den Haag

31 mei 2017

Datum:


1 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD5040020171964



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Triskelion BV T.a.v Crediteurenadministratie
Postbus 844
3700 AV ZEIST


**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
AVD5040020171964
Bijlagen
2

Datum 1 juni 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 1 juni 2017
Vervaldatum: 1 juli 2017
Factuurnummer: 171964
Ordernummer: Triskelion bestelnummer 56001154

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD5040020171964	€ 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: [REDACTED]
Verzonden: maandag 19 juni 2017 20:56
Aan: [REDACTED] info@zbo-ccd.nl
Onderwerp: RE: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag AVD5040020171964

Categorieën: Dossier [REDACTED]

Beste [REDACTED]

Dank voor het consulteren van de ethische commissie nu er onduidelijkheid is ontstaan bij jou. Graag lichten we dit nog toe.

Zoals je in het advies hebt kunnen lezen hebben wij zeer uitgebreid gediscussieerd over de belangrijkste uitleesparameter die aangevoerd wordt in dit project. Namelijk het al dan niet overleven van de influenza infectie. Wij hebben deze discussie zo uitgebreid mogelijk weergegeven in het advies. Het al dan niet toepassen van verlichtende middelen tegen de infectie hangt hier nauw mee samen. Omdat dit direct van invloed zal zijn op deze uitleesparameter. Wij hebben gezien het antwoord van de onderzoekers dat passend is in deze strategie hier geen bijzonderheden gesignaleerd. Discussies raken vaak meer dan 1 onderdeel van het advies omdat we nu veel specifieke vragen moeten beantwoorden. We begrijpen dat we het hokje hadden moeten aankruisen. We hopen dit hiermee verhelderd te hebben.

Groet [REDACTED]

[REDACTED] DEC TNO

From: info@zbo-ccd.nl [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]

Sent: Friday, 16 June, 2017 15:43

To: [REDACTED]

Subject: Verzoek aanvullende informatie projectvergunningaanvraag AVD5040020171964

Geachte DEC-TNO,

Op 31-05-2017 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Research for the development of products to treat and prevent influenza virus infection.' met aanvraagnummer AVD5040020171964.

De aanvrager geeft aan dat er niet altijd pijnbestrijding wordt toegepast. In uw advies geeft u onder C9 aan dat er geen bijzonderheden zijn. Kunt u dit toelichten en of het niet toepassen van pijnbestrijding is meegenomen in de ethische afweging?

Mocht u vragen hebben, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]
Centrale Commissie Dierproeven
www.centralecommissiedierproeven.nl

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

.....
T: 0900 2800028

E: info@zbo-ccd.nl



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Triskelion BV

Postbus 844

3704 HE ZEIST



**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

AVD5040020171964

Bijlagen

1

Datum 3 juli 2017

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 31 mei 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Research for the development of products to treat and prevent influenza virus infection." met aanvraagnummer AVD5040020171964. 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.

De voorwaarde met betrekking tot het onderzoeken van humane eindpunten om de dood als eindpunt te voorkomen is overgenomen van de DEC.

U kunt met uw project "Research for the development of products to treat and prevent influenza virus infection." starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een looptijd van maximaal 5 jaar kan hebben

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.

Er is sprake van ernstig ongerief.

Datum:
3 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD5040020171964

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-TNO gevoegd. Dit advies is opgesteld op 26 mei 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Bezwaar

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
na 

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: Triskelion BV
Adres: Postbus 844
Postcode en plaats: 3704 HE ZEIST
Deelnemersnummer: 50400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 januari 2018 tot en met 31 december 2022, voor het project "Research for the development of products to treat and prevent influenza virus infection." met aanvraagnummer AVD5040020171964, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-TNO. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 31 mei 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 mei 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 mei 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 26 mei 2017, ontvangen op 31 mei 2017.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Influenza virus challenge model				
	Muizen (<i>Mus musculus</i>) /	9.000	25% Ernstig 50% Matig 25% Licht	

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 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst de dierproeven conform de vergunning waren.

Aanvraagnummer:
AVD5040020171964

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

Er wordt per experiment met de IvD afgestemd of de dood als eindpunt noodzakelijk is, gerelateerd aan de fase van ontwikkeling of de mogelijke toepassing van het product.

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.

Voorafgaand aan ieder experiment wordt door de IvD beoordeeld of er humane eindpunten zoals het aan- of afwezig zijn van lethargie, gewichtsverlies, ademhalingsproblemen (bijvoorbeeld pompende ademhaling) en sociale isolatie, toe te passen zijn om de dood als eindpunt te voorkomen.



Aanvraagnummer:

AVD5040020171964

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 onvereenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

Aanvraagnummer:
AVD5040020171964

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

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 W17-12									
nr.	documenten NTS20171984	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2			x					
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3			x					
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Verzoek aanvulling aanvraag				x		x	x	
10	Reactie verzoek aanvulling			x					
11	Advies CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x	x	

1984

1.

08 JUNI 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 10300 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn
		KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	Geert Grooteplein 29
		Postbus	9101, [redacted]
		Postcode en plaats	6500HB Nijmegen
		IBAN	NL90ABNA0231209983
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[redacted]
		Afdeling	[redacted]
		Telefoonnummer	[redacted]
		E-mailadres	[redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- | | | |
|-----------------------------|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | [REDACTED] | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie | Instantievoor Dierenwelzijn | |
| Afdeling | [REDACTED] | |
| Telefoonnummer | [REDACTED] | |
| E-mailadres | [REDACTED] | |
- 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 |
| <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 7 _ 2 0 1 7 |
| Einddatum | 3 0 _ 0 6 _ 2 0 2 2 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- | |
|--|
| Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen? |
|--|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- | |
|--|
| Kan de anti-ontstekingsstof Interleukine-37 (IL37) de gewrichtsschade tijdens experime |
|--|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---|
| Naam DEC | RU DEC |
| Postadres | Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED] |
| E-mailadres | [REDACTED] |

4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1.541,00 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

5 Checklist bijlagen

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



6 Ondertekening

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

Centrale Commissie
Dierproeven
Postbus 20401
2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

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

Naam	
Functie	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats	Nijmegen
Datum	01 - 06 - 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'. | 10300 |
| 1.2 | Provide the name of the licenced establishment. | Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen |
| 1.3 | Provide the title of the project. | Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen? |

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.
-

Artrose is een gewrichtsziekte die gekenmerkt wordt door progressief verlies van het kraakbeen. Dat wil zeggen dat artrose langzaam erger wordt en niet herstelt. Bij verlies van het kraakbeen ontstaat er wrijving tussen de onderliggende botten van het gewricht, wat zorgt voor veel pijn tijdens het bewegen van het aangedane gewicht. Dit beperkt artrosepatiënten sterk in hun dagelijkse bezigheden en vermindert hun kwaliteit van leven sterk. Op dit moment is er geen therapie om kraakbeenschade bij artrosepatiënten tegen te gaan of de progressie hiervan te remmen.

De oorzaak van het ontstaan van artrose is niet bekend. Vroeger werd vaak gedacht dat artrose ontstaat door veroudering en slijtage, maar steeds meer onderzoek wijst uit dat ontstekingsfactoren en kraakbeen afbrekende enzymen belangrijk zijn voor het artroseproces [1-4]. Gezond kraakbeen bestaat uit kraakbeencellen die omgeven zijn door matrix. Belangrijke componenten van deze matrix zijn proteoglycanen en collagenen. Proteoglycanen kunnen watermoleculen binden, wat ervoor zorgt dat het kraakbeen kan werken als een schokdemper. De collagenen zijn belangrijk voor de stevigheid en elasticiteit van het kraakbeen. Kraakbeencellen zijn verantwoordelijk voor het in stand houden van een gezonde matrix [5]. Dit doen zij door een balans te handhaven tussen de aanmaak van proteoglycanen en collagenen en de afbraak van deze matrix moleculen met behulp van matrix afbrekende enzymen zoals matrix metalloproteinases (MMPs) en a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTSs). Tijdens artrose vindt er een verhoging van matrix afbrekende plaats en ook ontstekingsfactoren zijn in staat om kraakbeencellen dusdanig te activeren, dat er verhoogde productie van MMPs en ADAMTSs is, hetgeen uiteindelijk leidt tot kraakbeenafbraak [6]. Behalve ontstekingsfactoren kan ook een hoge mechanische stress de kraakbeencel activeren tot productie van matrix afbrekende enzymen en leiden tot kraakbeenafbraak [7]. Het blokkeren van de productie van matrix afbrekende enzymen en ontstekingsfactoren is in beide gevallen een veelbelovende benadering om de progressie van kraakbeenschade te remmen.

Recente studies hebben Interleukine 37 (IL37) geïdentificeerd als nieuw lid van de IL1 familie. De meeste genen die behoren bij de IL1 familie hebben een sterk pro-ontsteking karakter, terwijl IL37 anti-ontstekings eigenschappen heeft en in staat is om de aangeboren immuunresponses te onderdrukken. Zo is aangetoond dat verhoging van de IL37 spiegels in de humane A549 epitheliale cellijn en de muis RAW macrofagen cellijn, de productie van ontstekingsfactoren als IL1 α , TNF α and IL6 verlaagt [8]. Daarnaast is aangetoond dat IL37 transgene muizen beschermd zijn tegen

LPS-geïnduceerde shock, hepatitis en longontsteking [8-10]. Voor muizen is geen IL37 homoloog gevonden, maar aangezien ze wel reageren op IL37 in de transgene diermodellen beschikken ze wel over de receptoren die nodig zijn voor het anti-ontstekings effect van IL37. De anti-ontstekings effecten van IL37 zijn ook gedemonstreerd in bloedcellen van reumatoïde artritispatiënten, waarin verhoging van de IL37 spiegels leidt tot een verlaagde productie van IL1 α , TNF α en IL6 [11].

Om aan te tonen dat het plausibel is dat IL37 positieve effecten heeft op kraakbeen en dus mogelijk een positief effect zou kunnen hebben in artrose, hebben we eerst *in vitro* experimenten uitgevoerd om te kijken of IL37 de potentie heeft om de productie van ontstekingsfactoren en matrix afbrekende enzymen te reduceren in kraakbeencellen van artrosepatiënten. Hiervoor hebben we kraakbeen ontvangen van artrose patiënten die een knie of heup vervanging kregen. In deze kraakbeencellen hebben we de IL37 spiegels verhoogd met behulp van een IL37-adenovirus, dat cellen aanzet tot productie van IL37. Vervolgens hebben we de kraakbeencellen gestimuleerd met ontstekingsfactoren zoals IL1 β , om een ontstekingsomgeving na te bootsten die lijkt op die in artrosepatiënten. Op zowel eiwit als gen niveau hebben we gevonden dat IL37 instaat is om zowel de ontstekingsfactoren IL1 β , IL6 en IL8 te verlagen, als de matrix afbrekende enzymen MMP1, MMP3, MMP13 en ADAMTS5 [12]. Doordat we hadden gevonden dat IL37 niet alleen de productie van ontstekingsfactoren verlaagt maar ook een direct effect kan hebben op het kraakbeen via de kraakbenafbrekende enzymen, wilden we ook het effect van IL37 op de proteoglycanen in de matrix van het kraakbeen bestuderen. Hiervoor hebben we kraakbeen biopsie genomen, ook wel explants genoemd, en deze geïncubeerd met recombinant-IL37 eiwit. Omdat we het directe effect van IL37 op het kraakbeen wilden bestuderen, hebben we voor deze experimenten geen ontstekings-component zoals IL1B toegevoegd. Voor dit experiment konden we geen IL37-adenovirus gebruiken, omdat een adenovirus te groot is om door te dringen door de matrix van het kraakbeen. We vonden dat IL37 significant de uitscheiding van proteoglycanen remt vanuit de kraakbeen explants met maar liefst 32% ten opzichte van de ongestimuleerde explants. Dit geeft aan dat IL37 in kraakbeen van artrose patiënten niet alleen de aanwezige ontsteking kan remmen en daarmee de progressie van kraakbeenschade kan voorkomen, maar dat IL37 waarschijnlijk ook de mate van kraakbeenafbraak tijdens artrose kan verminderen via een direct effect op het kraakbeen zelf zonder dat er ontsteking aanwezig is. Hierdoor kan IL37 een beschermend effect hebben tegen kraakbeenschade in verschillende typen van artrose, die hieronder in verschillende experimentele artrose modellen beschreven staan.

Met de resultaten uit de literatuur en op basis van onze eigen bevindingen, kunnen we zeggen dat IL37 een belangrijke rol speelt om ontstekingsfactoren en matrix afbrekende enzymen te remmen *in vitro*, in een situatie die artrose, zo goed als mogelijk is, *in vitro* na kan bootsen. We weten echter ook dat artrose een zeer complexe ziekte is, waarbij meerdere weefsels betrokken zijn en dat de oorzaak van artrose waarschijnlijk een combinatie is van metabole processen en mechanische belasting. Om echt iets te kunnen zeggen over het effect van IL37 op kraakbeenschade tijdens het proces van artrose, is het daarom belangrijk om IL37 te testen in een geheel intact gewricht. Hiervoor zullen we twee verschillende experimentele artrose modellen in muizen gebruiken, omdat in elk model een ander type artrose pathogenese is vertegenwoordigd:

DMM-model (destabilisatie van de mediale meniscus-model) [13]

In het DMM-model wordt het ligament waarmee de mediale meniscus van de knie aangehecht zit aan het bot doorgesneden onder narcose met pijnstilling. Vervolgens wordt het gewrichtskapsel en de huid gehecht. Dit zorgt ervoor dat de mediale meniscus niet langer stabiel op zijn natuurlijke plek vast zit en kan schuiven. Hierdoor ontstaat net als bij mensen met trauma-geïnduceerde artrose (bijvoorbeeld sporters), kraakbeenschade die initieel aan de zijde ontstaat waar de meniscus los zit. Dit model vertoont minimale ontsteking.

CiOA-model (collagenase-model) [14]

Bij het CiOA-model wordt intra-articulair maximaal 3 keer collagenase ingespoten. Dit zorgt ervoor dat de ligamenten slapper worden waardoor het gewricht instabiel wordt en er bovendien ontsteking optreedt. De ontsteking is in dit model prominent aanwezig in tegenstelling tot het DMM-model. Dit model is daarom representatief voor artrose bij mensen waarbij ontsteking van belang is.

Met de in dit voorstel beschreven proeven zullen we onderzoeken of IL37 beschermt tegen kraakbeenschade tijdens artrose in twee verschillende muismodellen. Deze proeven zullen inzicht verschaffen in welke type artrose IL37 een belangrijke therapeutische rol kan spelen. Mochten de resultaten uit deze dierstudies leiden tot de conclusie dat IL37 beschermt tegen artrose, dan gaan we op zoek naar een klinische toepassing voor IL37. Het toedienen van IL37 middels een adenovirus in artrose patiënten, brengt tot op heden te veel risico's met zich mee en is nog niet veilig voor artrose patiënten. Wel bestaan er andere mogelijkheden om IL37 therapeutisch te maken, zoals de ontwikkeling van een 'small molecule' die homoloog is aan IL37. Echter, eerst zullen we de resultaten uit de beschreven dierstudies moeten afwachten voordat we kunnen beginnen met de ontwikkeling van IL37-therapie voor artrose patiënten.

Referenties:

1. Sokolove J, Lepus CM. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Ther Adv Musculoskelet Dis* 2013; 5:77-94
2. Kapoor M, Martel-Pelletier. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7:33-42
3. Loeser RF. Molecular mechanisms of cartilage destruction: mechanics, inflammatory mediators, and aging collide. *Arthritis Rheum* 2006; 54:1357-60
4. Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 2001; 44:1237-47
5. Fox A, Bedi A. The Basic Science of Articular Cartilage. *Sports Health* 2009; 1(6):461-468
6. Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1824(1):133-145
7. Buckwalter J, Anderson D. The roles of mechanical stresses in the pathogenesis of osteoarthritis. *Cartilage* 2013 4(4):286-294
8. Nold M, Nold-Petry C. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nature Immunology* 2010 11(11):1014-1024
9. Bulau A, Fink M. In vivo expression of interleukin-37 reduces local and systemic inflammation in concanavalin A-induced hepatitis. *Scientific World Journal* 2011 11:2480-90
10. Moretti S, Bozza S. IL-37 inhibits inflammasome activation and disease severity in murine aspergillosis. *Plos Pathog* 2014 10(11)
11. Ye L, Jiang B. IL-37 alleviates rheumatoid arthritis by suppressing IL-17 and IL-17 triggering cytokine production and limiting Th17 cell proliferation. *J Immunol* 2015 194:5110-9
12. Van Geffen E, Van Caam A. IL37 dampens the IL1 β -induced catabolic status of human OA chondrocytes. *Rheumatology* 2016
13. Glasson S, Blanchet T. The surgical destabilization of the medial meniscus (DMM) model of osteoarthritis in the 129/SvEv mouse. *Osteoarthritis and Cartilage* 2007 15:1061-1069. Kraan P, Vitters E. Degenerative knee joint lesion in mice after a single intra-articular collagenase injection. A new model of osteoarthritis. *J. Exp. Path* 1990 71:19-31

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?

Plaatsing van dit project: financiering en ons laboratorium

Dit project is onderdeel van een project dat is gefinancierd door het reumafonds getiteld "Interleukin-37 and phospho-Smad 3, critical couple in the prevention of chondrocyte activation and OA development". Ons laboratorium is expert op het gebied van artrose modellen [1-8]. Wij staan internationaal dan ook bekend om onze kennis en kunde op dit gebied en de unieke positie om meerdere artrose modellen en daarmee meerdere vormen van artrose te kunnen onderzoeken [9-11].

Hypothese en doelstellingen

Ontstekingsfactoren en verhoogde enzymatische activiteit van matrix afbrekende enzymen worden gezien als essentieel onderdeel in het ontstaan van kraakbeenschade. Onze hypothese is dan ook dat een door IL37-gemedieerde reductie in ontstekingsfactoren en matrix afbrekende enzymen zorgt voor het handhaven van de kraakbeen integriteit. IL37 is een relatief nieuw ontdekte anti-ontsteking cytokine, waarvan we *in vitro* hebben aangetoond dat IL37 de productie van ontstekingsfactoren en matrix afbrekende enzymen kan remmen. Echter, deze bevindingen van IL37 zijn nog nooit vertaald naar een effect op kraakbeenschade in een intact gewricht met artrose.

Onderzoeksdoel:

In dit project zullen we antwoord krijgen op de vraag of IL37 het artroseproces en de daarbij ontwikkelde gewrichtsschade kan remmen of zelfs voorkomen.

De deeldoelstellingen in dit project zijn:

1. Valideren en in kaart brengen van het expressieprofiel van het IL37-adenovirus. Voordat we beginnen met de experimentele artrosemodellen, zullen we eerst een experiment uitvoeren waarin we het expressieprofiel van het IL37-adenovirus gaan bepalen zodat we inzicht krijgen in hoe snel het adenovirus in staat is om hoge IL37 spiegels te produceren en hoe lang deze productie aanhoudt. Tegelijkertijd zullen we mogelijke neveneffecten van het IL37-adenovirus op het weefsel in het gewricht onderzoeken. Het is belangrijk om de resultaten van deze proeven te hebben voor een goede timing van injectie in onze experimentele artrosemodellen.
2. Bepalen of IL37 gewrichtsschade remt in het DMM-model (model voor traumaïnduceerde artrose met zeer lage ontsteking)
3. Bepalen of IL37 gewrichtsschade remt in het CiOA-model (collagenase model voor inductie van artrose waarbij naast laxiteit van het gewricht ook verhoogde mate van ontsteking een rol speelt).

We verwachten dat bovenstaande experimenten uitgevoerd kunnen worden binnen dit 5-jaren project: de voorgestelde diermodellen zijn gestandaardiseerd en worden binnen onze afdeling reumatologie regelmatig toegepast. De technieken voor het beoordelen van het effect van de interventie zijn geoptimaliseerd en frequent gebruikt.

Referenties:

1. van der Kraan PM, Vitters E. Degenerative knee joint lesions in mice after a single intra-articular collagenase injection. A new model of osteoarthritis. *J. Exp. Pathol (Oxford)* 1990; 71(1):19-31
2. van Osch GJ, van der Kraan PM. Induction of osteoarthritis by intra-articular injection of collagenase in mice. Strain and sex related differences. *Osteoarthritis and Cartilage* 1993; 1(3):171-7
3. van der Kraan PM, Vitters EL. Development of osteoarthritic lesions in mice by "metabolic" and "mechanical" alterations in the knee joints. *Am J Pathol.* 1989; 135(6):1001-14
4. van Dalen *et al.* Interleukin-1 is not involved in synovial inflammation and cartilage destruction in collagenase-induced osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2017; 25(3):385-396
5. de Munter W *et al.* High LDL levels lead to increased synovial inflammation and accelerated ectopic bone formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 2016; 24(5):844-55
6. van den Bosch M *et al.* Induction of Canonical Wnt Signaling by the Alarmins S100A8/A9 in murine knee joints: implications for osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatology* 2016; 68(1):152-163
7. Schelbergen RF *et al.* Prophylactic treatment with S100A9 inhibitor paquinimod reduces pathology in experimental collagenase-induced osteoarthritis. *Annals Rheumatic disease* 2015; 74(12):2254-8
8. Blaney Davidson E *et al.* Inducible chondrocyte-specific overexpression of BMP2 in young mice results in severe aggravation of osteophyte formation in experimental OA without altering cartilage damage. *Annals of Rheumatic Disease* 2015; 74(6):1257-64
9. Thysen S *et al.* Targets, models and challenges in osteoarthritis research (Review). *Disease Models & mechanisms* 2015 8:17-30
10. Christiansen B *et al.* Non-invasive mouse models of post-traumatic osteoarthritis (Review). *Osteoarthritis and Cartilage* 2015 23:1627-1638
11. Brandt *et al.* Animal models of osteoarthritis (Review). *Biorhelogy* 2002 221-235.

3.3 Relevance

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

Artrose is de meest voorkomende gewrichtsziekte. Naar schatting waren er in 2015 in Nederland 1,2 miljoen bij mensen waarbij de huisarts de diagnose artrose heeft gesteld. De jaar prevalentie bij vrouwen is hoger dan bij mannen, met 92,4 artrose patiënten per 1000 vrouwen en 48,8 artrose patiënten per 1000 mannen. Knieartrose is de meest voorkomende artrose (594.000 personen), gevolgd door heupartrose (359.000) en artrose aan overige ledematen (357.000 personen) (Bron: RIVM).

Artrose komt vaker voor naarmate men ouder wordt. Gezien de vergrijzing in onze samenleving, zal het aantal mensen met artrose alleen maar toe gaan nemen. Artrose is geen aandoening waar mensen aan overlijden, maar de kwaliteit van het leven van de patiënten gaat dramatisch achteruit doordat ze veel minder mobiel zijn en vaker leiden aan depressies. Omdat afbraak van het kraakbeen een degeneratief proces is en het kraakbeen een beperkte reparatiecapaciteit heeft, is op dit moment een gewrichtsvervanging de enige oplossing die artsen kunnen bieden. Op langere termijn komt het voor dat er complicaties ontstaan, zoals een infectie van de gewrichtsprothese.

Naast een toename van aantal artrosepatiënten nemen ook de kosten van de zorg voor artrose toe. Deze bedroegen in 2011 1,1 miljard euro. Dat komt overeen met 1,2% van de totale kosten van de gezondheidszorg in Nederland. Het aandeel in de kosten voor artrose was groter voor vrouwen (71%) dan voor mannen (29%). Voor personen onder de 40 jaar waren de kosten relatief weinig (Bron: RIVM).

Deze studie zal inzicht verschaffen of IL37 het degeneratief proces van kraakbeenafbraak kan remmen of voorkomen. Tevens zullen we inzicht krijgen bij welke type artrose pathogenese IL37 een beschermend effect kan hebben op kraakbeenschade. Met deze resultaten kunnen we bepalen welk type artrosepatiënt mogelijk gebaat is bij behandeling met IL37 en dit zal nieuwe aangrijpingspunten opleveren voor een therapie voor artrose.

3.4 Research Strategy

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

Voor dit project zal gebruik worden gemaakt van het IL37-adenovirus, om het effect van IL37 te bestuderen op kraakbeenschade tijdens artrose. Hiervoor zal het adenovirus intra-articulair worden ingespoten in het kniegewricht van de muis, zodat hoge IL37 spiegels in het gewricht aanwezig zijn. Het adenovirus is gevalideerd *in vitro*, waarbij we hebben gezien dat het virus in staat is om zowel IL37 gen als eiwit expressie in kraakbeencellen te verhogen. Daarnaast hebben aangetoond dat dit virus *in vitro* ook in staat is de productie van ontstekingsfactoren en matrix afbrekende enzymen te reduceren, wat betekent dat het geproduceerde IL37 ook functioneel is.

Voordat we gaan starten met de experimentele artrosemodellen, zullen we een experiment uitvoeren om te bepalen of het IL37-adenovirus ook werkt in muizen. Hierin we testen hoe lang het duurt voordat het virus in staat is om hoge IL37 spiegels te produceren en hoe lang deze spiegels aanhouden. Met deze gegevens kunnen we een optimale timing van de IL37-adenovirus injecties bepalen die nodig zijn om de juiste condities en timing vast te stellen voor de experimentele artrosemodellen. Verder is er vanuit de literatuur bekend dat muizen geen IL37 homoloog hebben, waardoor we alvorens andere proeven uit te voeren met zekerheid willen uitsluiten dat dit virus om onvoorziene redenen schade aanbrengt aan het gewricht. In dergelijke gevallen zullen dan ook de overige proeven niet worden uitgevoerd. We achten de kans hierop zeer klein, omdat er in dit literatuur verschillende experimenten zijn beschreven waarbij muizen IL37 toegediend kregen. Hiervan zijn geen bijwerkingen beschreven. Echter, omdat IL37 nog nooit middels dit adenovirus is toegediend willen we dit met zekerheid uitsluiten.

Onze uitleesparameter is: kraakbeenschade

Om te onderzoeken of IL37 een beschermend effect heeft op kraakbeenschade tijdens artrose, zullen de muizen op verschillende tijdstippen na inzetten van de proef geofferd worden. Voor alle hieronder beschreven proeven geldt dat weefsels geïsoleerd worden voor bijvoorbeeld histologie, wash-outs en RNA.

- Op histologie kan structurele schade aan het gewricht worden vastgesteld met behulp van de gemodificeerde OARSI score [15]. Dit is een score voor artrotische veranderingen in het kraakbeen zoals fibrillaties, scheurtjes en verlies van het kraakbeen alsmede de uitbreidbaarheid daarvan.
- Met behulp van wash-outs en RNA kunnen we op eiwit en gen niveau, respectievelijk, de kwaliteit van het kraakbeen en synovium beoordelen op markers van artrose, zoals de ontstekingsfactoren IL1 β , IL6 en IL8 en de matrix afbrekende enzymen MMPs en ADAMTSs.

Doelstelling 1: Validatie van het IL37-adenovirus in muizen (DAP1).

In deze proeven zullen we onderzoeken of het IL37-adenovirus in staat is om IL37 gen en eiwit spiegels tot expressie te brengen in muizen, hoe lang deze IL37 spiegels aanhouden en hoe de kinetiek verloopt. Tegelijkertijd zullen we onderzoeken of het IL37-adenovirus zelf geen schade aan het gewricht brengt. Hiertoe zullen we naïeve muizen injecteren met het IL37-adenovirus of luciferase (Luc)-controle virus, om te corrigeren voor mogelijk virus effect. Het totale experiment zal maximaal 28 dagen duren, waarbinnen op maximaal zeven verschillende momenten in tijd, bijvoorbeeld dag 0, 1, 3, 7, 14, 21 en 28 weefsels verzameld worden voor bijvoorbeeld histologie, wash-outs en RNA isolatie.

Na het vaststellen van de kinetiek van IL37 na adenovirale overexpressie en het uitsluiten van negatieve effecten van IL37 in het gewricht, zal het potentiële therapeutische effect van IL37 worden getest in twee diersmodellen voor artrose: de DMM (DAP 2) en de CiOA (DAP 3).

Doelstelling 2: Bepalen of IL37 gewrichtsschade remt in het DMM-model (DAP 2)

Het DMM-model is een equivalent aan trauma in mensen waarbij bijvoorbeeld dislocaties optreden. In dit model wordt door middel van transectie van het ligament, dat de mediale meniscus verbindt met de tibia, het gewricht instabiel gemaakt. Door ligament transectie schuift de meniscus opzij en ontstaat er instabiliteit. In eerste instantie ontstaat er kraakbeenschade aan de mediale zijde van het gewricht, maar later ook aan de laterale zijde. Dit is dus een goed model voor patiënten met artrose ten gevolge van trauma. In dit model is de ontsteking relatief laag en wordt daarom veelal afgezet met het hieronder beschreven CiOA-model, dat veel ontsteking heeft. In het DMM-model zullen we bestuderen of IL37 de inductie van gewrichtsschade kan vertragen of voorkomen en of IL37 de progressie van de al aanwezige gewrichtsschade kan remmen.

Om dit te onderzoeken zullen we in het DMM-model twee afzonderlijke experimenten uitvoeren, waarin het moment van start van de IL37-adenovirus injectie verschillend is:

1. Injectie van het IL37-adenovirus vroeg na inductie van het DMM-model, bijvoorbeeld dag 5. Dit om te onderzoeken of vroege toediening van IL37 leidt tot minder en vertraagde inductie van kraakbeenschade naar mate het model vordert. Met deze proef kunnen we aantonen of we kort na trauma al profylactisch IL37 zouden moeten toedienen om latere gewrichtsschade te voorkomen. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit doelstelling 1.
2. Injectie van het IL37-adenovirus nadat er al echte gewrichtsschade aanwezig is in het DMM-model, bijvoorbeeld week 4. Dit om te onderzoeken of IL37 ook in staat is om de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade te remmen. Met deze proef kunnen we aantonen of het zinvol is om patiënten te behandelen wanneer er al milde schade is ontstaan. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit doelstelling 1.

Doelstelling 3: Bepalen of IL37 gewrichtsschade remt in het CiOA-model (DAP 3)

Het CiOA-model is een artrosemodel representatief voor patiënten met artrose en grote betrokkenheid van ontsteking. Het is een model waarbij instabiliteit en ontsteking voor artrose zorgen. Dit model wordt veroorzaakt door injectie van collagenase, wat ervoor zorgt dat de ligamenten van het gewricht slap worden en het gewricht instabiel. Dit gaat gepaard met meer ontsteking dan in het DMM model waarbij ontsteking amper aanwezig is. In het CiOA-model bepalen we of IL37 de gewrichtsschade kan vertragen of voorkomen en of IL37 de progressie van de al aanwezige gewrichtsschade kan remmen.

Om dit te onderzoeken zullen we in het CiOA-model twee afzonderlijke experimenten uitvoeren, waarin het moment van start van de IL37-adenovirus injectie verschillend is:

1. Injectie van het IL37-adenovirus vroeg na inductie van het CiOA-model, bijvoorbeeld dag 5. Dit om te onderzoeken of vroege toediening van IL37 instaat is om de geïnduceerde ontsteking te temperen en leidt tot minder en vertraagde kraakbeenschade naar mate het model vordert. Met deze proef kunnen we aantonen of we kort na inductie van ontsteking aan het gewricht, door bijvoorbeeld knieletsel, al profylactisch IL37 zouden moeten toedienen om latere gewrichtsschade te voorkomen. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit doelstelling 1.
2. Injectie van het IL37-adenovirus nadat er al beginnende schade zichtbaar is in het CiOA-model, bijvoorbeeld week 4. Dit om te onderzoeken of IL37 ook in staat is om de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade te remmen in een artrose model met ontsteking. Met deze proef kunnen we aantonen of het zinvol is om patiënten te behandelen wanneer er al beginnende schade is ontstaan. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit doelstelling 1.

Doelstelling 1 is van belang voor het valideren van het IL37-adenovirus in muizen. Deze informatie hebben we nodig voor de timing van de IL37-adenovirus injecties in de experimentele artrosemodellen. Mochten we erachter komen dat het adenovirus niet functioneel is in muizen of al zichtbare schade aanbrengt aan het gewricht, dan hoeven we niet verder te gaan met de uitvoering van de experimentele artrosemodellen en moeten we een andere strategie bedenken om IL37 tot expressie te brengen in muizen. Naar eigen verwachting gebaseerd op onze ruime ervaring met adenovirus injecties in muizengewrichten en gebaseerd op de literatuur, gaan we ervan uit dat we hierbij geen problemen gaan ondervinden. In doelstelling 2 en 3 ligt de focus op het onderzoek naar het effect van IL37 op gewrichtsschade tijdens artrose. Aan de hand van doelstelling 2 en 3 kunnen we een uitspraak doen over welke type artrose pathogenese in welk stadium te behandelen is met IL37.

Referentie:

1. Pritzker K, Gay S. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006 15(1):13-29

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.

Doelstelling 1: Validatie van het IL37-adenovirus in muizen (DAP1).

In deze proeven onderzoeken we of het IL37-adenovirus in staat is het IL37 gen en eiwit tot expressie te brengen in het kniegewricht van muizen en tevens vaststellen hoe lang IL37 aanwezig blijft. Tegelijkertijd zullen we onderzoeken of IL37 zelf geen schade aan het gewricht brengt. Hiertoe zullen we naïeve muizen intra-articulair (in de knie) injecteren met het IL37-adenovirus of luciferase (Luc)-controle virus, om te corrigeren voor het virus effect. Het adenovirus infecteert het synoviale kapsel van het gewricht, waardoor de hierin aanwezige cellen IL37 zullen maken. Vervolgens zullen op maximaal vijf verschillende momenten in tijd, bijvoorbeeld dag 1, 3, 7, 14 en 28 weefsels verzameld worden voor histologie, wash-outs en RNA isolatie en vergeleken worden met niet adenovirus geïnjecteerde dag 0 samples. Wanneer we geen IL37 gen of eiwit spiegels kunnen detecteren in het weefsel en IL37 zorgt voor significant meer gewrichtsschade en kraakbeendepletie ten op zichte van de controle groep, hebben we een no-go moment en zullen de hieronder beschreven vervolgentoetsen niet worden uitgevoerd.

Het IL37-adenovirus dat we zullen injecteren in de muizen is uitvoerig getest *in vitro* met humane artrose kraakbeencellen en laat 48 h na transductie hoge IL37 expressie zien op zowel gen als eiwit niveau in vergelijking met het luciferase (Luc)-controle virus. Echter, we weten niet of dit virus hetzelfde expressiepatroon vertoont in een levend organisme en intact gewricht zoals in de muis. Aangezien het injecteren van het IL37-adenovirus de basis vormt voor onze experimentele artrosemodellen, zullen we met dit experiment meer inzicht krijgen in het expressieprofiel van

het IL37-adenovirus in de muis. De resultaten van dit experiment zijn van belang voor het optimaliseren van de timing en frequentie van de IL37-adenovirus injecties tijdens de experimentele artrosemodellen.

Na validatie van het IL37-adenovirus, gaan we verder met experimentele artrose modellen om het type artrose te bepalen waarbij IL37 een beschermend effect kan hebben op de progressie van kraakbeenschade. IL37 is beschreven als een stof, dat instaat is om de ontsteking te remmen. Dit hebben wij ook aangetoond in kraakbeencellen, waarbij IL37 in staat was om de IL1B-geïnduceerde ontsteking te remmen. Echter, wij hebben ook gezien dat IL37 zelf een direct effect heeft op kraakbeen zonder dat er ontsteking aanwezig is. Mogelijk beschermt IL37 dus ook niet alleen via reductie in ontsteking maar ook via de kraakbeenafbrekende enzymen. Om deze verschillende type artrose te onderzoeken, hebben we gekozen voor twee experimentele artrose modellen; het DMM-model (DAP2) en CiOA-model (DAP3). Doordat IL37 kan aangrijpen op twee verschillende aspecten van artrose (ontsteking en kraakbeenafbrekende enzymen) zullen het CiOA-model en DMM-model onafhankelijk van elkaar onderzocht worden en is er geen go/no go moment mogelijk.

Doelstelling 2: Bepalen of IL37 gewrichtsschade remt in het DMM-model (DAP 2).

In het DMM-model wordt gewrichtstrauma nagebootst door het menisco-tibiale ligament dat de meniscus aan de tibia verbindt door te snijden. Hierdoor kan de meniscus verschuiven en ontstaat er instabiliteit van het gewricht. Het is een lokaal model, waardoor je in het begin van het model kraakbeenschade ziet ontstaan op de plek waar de meniscus instabiel is en pas later wanneer het model langer loopt (rond de 8 weken) zie je kraakbeenschade ontstaan op andere plekken in het gewricht. In dit model, representatief voor traumaïnduceerde artrose, kunnen we onderzoeken of gewrichtstrauma gecombineerd met verhoogde IL37 spiegels zorgt voor minder kraakbeenschade. Dit model lijkt sterk op wat er bijvoorbeeld bij sporters gebeurt, wanneer ze een scheur oplopen in een ligament. Deze mensen ontwikkelen later vaak artrose.

Met behulp van het adenovirus raken we het synoviale kapsel van het gewricht, waardoor de hierin aanwezige cellen IL37 zullen produceren. Het vaak injecteren van het adenovirus kan eventueel leiden tot immuun reacties, dat ervoor zorgt dat de werking van het IL37 virus ongedaan wordt gemaakt.

Op basis van de resultaten die uit doelstelling 1 voort komen, bepalen we de timing en frequentie van adenovirus injectie in de artrose modellen.

In het DMM-model treedt de eerste zeer milde schade op rond 4 weken, te beginnen met minimale fibrillatie van het kraakbeen. Rond 8 weken begint de schade toe te nemen waardoor het significant verschillend is van de controle groep en op 16 weken is er duidelijk waarneembare artrose zowel aan de mediale zijde waar de meniscus dislocatie heeft opgetreden alsmede de laterale zijde van het gewricht.

In het DMM-model zullen we op twee verschillende momenten in het model het IL37-adenovirus of Luc-controle virus injecteren:

1. Start met injectie van het IL37-adenovirus vroeg na inductie van het DMM-model, bijvoorbeeld dag 5. Dit om te onderzoeken of vroege toediening van IL37 leidt tot minder en vertraagde inductie van kraakbeenschade naar mate het model vordert. Met deze proef kunnen we aantonen of we kort na trauma al profylactisch IL37 zouden moeten toedienen om latere gewrichtsschade te voorkomen. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit doelstelling 1.
2. Start met injectie van het IL37-adenovirus nadat er al echte gewrichtsschade aanwezig is in het DMM-model, bijvoorbeeld rond week 4. Dit om te onderzoeken of IL37 ook in staat is om de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade te remmen. Met deze proef kunnen we aantonen of het zinvol is om patiënten te behandelen wanneer er al milde schade is ontstaan. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit doelstelling 1.

- We hebben gekozen om het effect van IL37 op kraakbeenschade te onderzoeken in twee verschillende fases van het DMM-model, om inzicht te krijgen in welke fase mensen met traumaïnduceerde artrose nog gebaat kunnen zijn met een behandeling met IL37.

-

Doelstelling 3: Bepalen of IL37 gewrichtsschade remt in in het CiOA-model (DAP 3)

In het CiOA-model wordt artrose geïnduceerd door injectie van collagenase, waardoor er laxiteit van de ligamenten ontstaat. Hierdoor wordt het gewricht in zijn geheel instabiel, wat gepaard gaat met veel ontsteking, in tegenstelling tot het DMM-model. Dit is geen focaal model, maar tast uiteindelijk alle kraakbeenvlakken aan. Door dit model te combineren met IL37-adenovirus injecties kunnen we bestuderen of artrose met ontsteking in aanwezigheid van IL37 zorgt voor minder kraakbeenschade.

In het CiOA-model treedt ontsteking op welke piekt tussen dag 3 en 7 na inductie van het model. De eerste (zeer milde) gewrichtsschade is zichtbaar rond 2 weken. Tussen de 3 en 4 weken is er matige schade zichtbaar en op 8 weken is er zeer duidelijk artrose aanwezig.

Net als in het DMM-model, zullen we ook in het CiOA-model op twee verschillende momenten in het model het IL37-adenovirus of Luc-controle virus injecteren:

1. Injectie van het IL37-adenovirus vroeg na inductie van het CiOA-model, bijvoorbeeld dag 5. Dit om te onderzoeken of vroege toediening van IL37 instaat is om de geïnduceerde ontsteking te temperen en leidt tot minder en vertraagde kraakbeenschade naar mate het model vordert. Met deze proef kunnen we aantonen of we kort na inductie van ontsteking aan het gewricht, door bijvoorbeeld knieletsel, al profylactisch IL37 zouden moeten toedienen om latere gewrichtsschade te voorkomen.
2. Injectie van het IL37-adenovirus nadat er al beginnende schade zichtbaar is in het CiOA-model, bijvoorbeeld week 4. Dit om te onderzoeken of IL37 ook in staat is om de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade te remmen in een artrose model met ontsteking. Met deze proef kunnen we aantonen of het zinvol is om patiënten te behandelen wanneer er al milde schade is ontstaan. We hebben gekozen om het effect van IL37 op kraakbeenschade te onderzoeken in twee verschillende fases van het CiOA-model, om inzicht te krijgen in welke fase mensen met artrose gecombineerd met ontsteking nog gebaat kunnen zijn met een behandeling met IL37.

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

Voordat de experimentele artrosemodellen van start zullen gaan, zal er eerst een experiment uitgevoerd worden om het IL37-adenovirus te valideren in muizen. Hiermee kunnen we de optimale timing van de IL37-adenovirus injectie bepalen tijdens de experimentele artrosemodellen. De experimentele artrosemodellen zijn hiervan afhankelijk. Tegelijkertijd onderzoeken we in dit experiment of het IL37-adenovirus zelf geen schade aan het gewricht aanbrengt. In het onvoorziene geval dat er toch gewrichtsschade ontstaat als gevolg van injectie met het IL37-adenovirus in vergelijking met het Luc-controle virus dan hebben we een no-go moment en gaan we niet verder tot uitvoering van de experimentele artrosemodellen.

Na validatie van het IL37-adenovirus, gaan we verder met experimentele artrose modellen om het type artrose te bepalen waarbij IL37 een beschermend effect kan hebben op de progressie van kraakbeenschade. IL37 is beschreven als een stof, dat instaat is om de ontsteking te remmen. Dit hebben wij ook aangetoond in kraakbeencellen, waarbij IL37 in staat was om de IL1B-geïnduceerde ontsteking te remmen. Echter, wij hebben ook gezien dat IL37 zelf een direct effect heeft op kraakbeen zonder dat er ontsteking aanwezig. Mogelijk beschermt IL37 dus ook niet alleen via reductie in ontsteking maar ook via de kraakbeenafbrekende enzymen. Om deze verschillende type artrose te onderzoeken, hebben we gekozen voor twee experimentele artrose modellen; het DMM-model (DAP2) en CiOA-model (DAP3). Doordat IL37 kan aangrijpen op twee verschillende aspecten van artrose (ontsteking en kraakbeenafbrekende enzymen) zullen het CiOA-model (instabiliteits en onstekings-model) en DMM-model (trauma-geïnduceerde artrose) onafhankelijk van elkaar onderzocht worden en is er geen go/no go moment mogelijk.

In beide artrosemodellen zullen we op twee verschillende momenten van het artroseproces starten met de IL37-adenovirus injecties, vroeg na inductie van het artrose model (fase 1) en wanneer er al zichtbare gewrichtsschade is opgetreden (fase 2). Zo kunnen we bepalen in welke fase van het artroseproces IL37 beschermend is tegen kraakbeenschade. In deze twee fases zijn de artrose ontwikkelingen verschillend, in fase 1 zit je nog meer in de initiatie van het artroseproces, terwijl in fase 2 het vooral gaat om de progressie van de aanwezige artrose en schade. Doordat deze fases verschillend zijn, hebben de resultaten uit beide proeven geen voorspellende waarde voor elkaar. Hierdoor kunnen we geen go/no-go strategie toepassen en zullen we de twee experimenten afzonderlijk van elkaar uitvoeren.

Door het uitvoeren van de twee verschillende artrose modellen kunnen we vaststellen bij welk type artrose en in welke fase van het artrose proces IL37 beschermend is tegen gewrichtsschade, wat sterke aanwijzingen kan geven voor eventuele IL37 therapie voor artrosepatiënten.

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	Validatie van het IL37-adenovirus in muizen
2	Effect van IL37 op gewrichtsschade in het DMM-model
3	Effect van IL37 op gewrichtsschade in het CiOA-model

Appendix**Description animal procedures**

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Validatie van het IL37-adenovirus in muizen

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.

Binnen deze DAP willen we onderzoeken wat het expressieprofiel is van het door het IL37-adenovirus geproduceerde IL37 eiwit in muizen. Tegelijkertijd willen we onderzoeken of het IL37-adenovirus geen schade aanbrengt aan gewrichtsstructuren, gezien het feit dat muizen geen IL37 homoloog hebben. De kans hierop achten we echter zeer klein, omdat er in de literatuur studies zijn beschreven met IL37-transgene muizen die geen fenotype hebben en waarvan duidelijke anti-inflammatoire effecten beschreven zijn.

Om dit te onderzoeken zullen we muizen intra-articulair injecteren in de knie met het IL37-adenovirus of Luc-controle virus. Het Luc-controle virus wordt meegenomen om te corrigeren voor het virus effect. We zullen muizen daarna offeren op maximaal 7 tijdstippen om vast te stellen op welk moment na adenovirus injectie de hoogste IL37 expressie tot stand is gekomen en hoe lang deze spiegels aanhouden. Dit zal in eerste instantie dag 0 zijn en 1, 3, 7, 14, 21 en 28 dagen na injectie zijn, hetgeen aangepast zou kunnen worden naar aanleiding van voortschrijdend inzicht. Op dezelfde dagen kan worden gekeken of er gewrichtsschade heeft plaats gevonden door IL37 expressie.

Primaire uitkomstparameter: IL37 expressie in het gewricht in de tijd

Als primaire uitkomstparameter gebruiken we IL37 expressie in het gewricht. Hiertoe worden op maximaal zeven verschillende momenten in tijd gewrichten geïsoleerd voor histologie en wash-outs, om IL37 eiwit expressie aan te tonen in het weefsel en te bestuderen of het IL37 eiwit ook wordt uitgescheiden. Daarnaast wordt de IL37 expressie ook bestudeerd op RNA-niveau. Hiervoor worden de gewrichten geïsoleerd om hier vervolgens synovium en kraakbeen uit te verwijderen voor RNA-isolatie.

Secundaire uitkomstparameter: Gewrichtsschade/-parameters

In de weefsels die we isoleren voor onze primaire uitkomstparameter, kunnen we ook beoordelen of het IL37-adenovirus ernstige gewrichtsschade heeft toegebracht in vergelijking met het Luc-adenovirus. Op histologie kunnen we structurele gewrichtsveranderingen ten gevolge van de IL37 of Luc-adenovirus injectie vaststellen met behulp van de modificeerde OARSI (Osteoarthritis Research Society International) score [1]. Dit is een score voor artrotische veranderingen in het kraakbeen zoals fibrillaties, scheurtjes en verlies van het kraakbeen alsmede de uitbreidbaarheid daarvan, zoals ontsteking.

Daarnaast zullen we ook markers voor kraakbeenschade op RNA-niveau bestuderen om de kwaliteit van het kraakbeen en synovium te beoordelen. Hiervoor zullen we onder andere kijken naar de productie van ontstekingsfactoren door zowel het synovium als kraakbeen zoals, IL1 β , IL6 en IL8, en de productie van matrix afbrekende enzymen zoals MMPs en ADAMTSs.

Referenties:

Pritzker K, Gay S. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006 15(1):13-29

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

Muizen worden onder anesthesie eenmaal eenzijdig intra-articulair geïnjecteerd met het IL37-adenovirus of Luc-controle virus. De andere knie zal niet worden gebruikt als interne controle, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten. Daarom is besloten om aparte muizen mee te nemen voor de Luc-adenovirus injecties. Het experiment zal maximaal 28 dagen duren, waarbinnen vervolgens op maximaal 7 verschillende momenten in tijd na adenovirus injectie monsters verzameld worden voor histologie, wash-outs en RNA isolatie om de IL37 expressie in tijd te volgen en te bestuderen of het IL37-adenovirus geen gewrichtsschade veroorzaakt. Dit zal in eerste instantie dag 0 zijn en dag 1, 3, 7, 14, 21 en 28 dagen na injectie.

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodige hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt.

Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt: $n = 1 + 2C(s/d)^2$. De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power ($1 - \beta$) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarden van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden, welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde. De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleid worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data. Omdat muizen van zichzelf geen IL37 tot expressie brengen, gaan we uit van een groot verschil tussen de Luc en IL37 adenovirus geïnjecteerde gewrichten en verwachten we een normale spreiding. Er kan echter wel variatie ontstaan in de hoogte van de IL37 expressie tussen de muizen en het expressiepatroon tussen de muizen. Uitgaande van een SD van 25 en een verschil tussen Luc en IL37 geïnjecteerde gewrichten van 40%, komt dat neer op $n = 7.1$, afgerond 8 muizen per groep.

Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken, aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door mogelijke systemische effecten. Daarom is besloten tot aparte controle muizen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

B. The animals

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

Species: Onderzoek naar kraakbeen kan alleen worden uitgevoerd in een modelsysteem waarbij het kraakbeen in zijn natuurlijke omgeving blijft en in een functionerend gewricht vergelijkbaar met de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een gewricht en een vergelijkbare interactie tussen de weefsels in het gewricht als de mens en met een vergelijkbaar immuunsysteem.

We willen de C57Bl/6 muizen gebruiken en het expressiepatroon van het IL37-adenovirus bestuderen in vrouwtjes muizen. We kiezen ervoor om het expressiepatroon van het IL37-adenovirus te bestuderen in **zowel vrouwtjes als mannetjes** muizen. **We hebben gekozen voor beide geslachten omdat we niet geheel zeker zijn of het expressiepatroon van het IL37-adenovirus hetzelfde zal zijn in beide geslachten.** In DAP2 (bijlage 3.4.4.3) wordt gebruik gemaakt van mannelijke dieren en in DAP3 (bijlage 3.4.4.3) wordt gebruik gemaakt van vrouwelijke dieren. De validatie experimenten van DAP1 (bijlage 3.4.4.1) zijn van groot belang voor de vervollexperimenten in DAP2 en DAP3, omdat we deze methode willen toepassen in de experimentele artrosemodellen. Door het expressiepatroon van het IL37-adenovirus in beide geslachten te onderzoeken kunnen we met zekerheid het juiste expressiepatroon bepalen voor de vervollexperimenten in de experimentele artrosemodellen van DAP2 en DAP3. Tevens kunnen we uitsluiten dat er verschillen zijn tussen het expressiepatroon van het IL37-adenovirus in mannelijke en vrouwelijke dieren. Mochten er inderdaad verschillen aanwezig zijn in het expressiepatroon van het IL37-adenovirus tussen mannelijke en vrouwelijke dieren, kunnen we onze vervollexperimenten in DAP2 en DAP3 optimaliseren aan de hand van de resultaten verkregen uit deze experimenten van DAP 1 (bijlage 3.4.4.1) voor zowel vrouwelijke als mannelijke dieren.

In experiment zullen we twee experimenten uitvoeren, hierdoor hebben we een globale fasering aangebracht. Eerst onderzoeken we via RNA samples en wash-outs of IL37 goed tot expressie wordt gebracht op gen en eiwit niveau. Mocht het adenovirus goed tot expressie komen, dan hebben we een go moment en zullen we vervolgens via histologie gaan kijken of het adenovirus zelf geen schade aanbrengt aan het gewricht. Mochten we er achter komen dat het IL37-adenovirus niet tot expressie komt, dan hebben we een no go moment en hoeven we ook geen experiment in te zetten voor histologie.

Age range: Jong-volwassen muizen, 10-14 weken oud.

Origin: Gecertificeerde leverancier, zoals Janvier, Jackson of Charles River

Estimated number of animals: Voor dit experiment hebben we maximaal **624** muizen nodig, gebaseerd op **twee geslachten (mannelijke en vrouwelijke dieren)** een maximum van 1x dag 0 controle groep met drie verschillende uitkomstparameters (histologie, wash-outs en RNA), vervolgt door 2 experimentele groepen (1: Luc-controle en 2:IL37-adenovirus behandelde groep) en per groep een schatting van 8 muizen per groep met 3

verschillende uitkomstparameters (histologie, wash-outs en RNA) op maximaal 6 verschillende tijdstippen. Voor histologie hebben we het gehele kniegewricht van de muis nodig en voor de andere twee uitkomstmaten (wash-outs en RNA) hebben we zowel het synovium als kraakbeen nodig om de schade te bestuderen. Hierdoor is het niet mogelijk om de verschillende uitkomstmaten binnen hetzelfde dier te meten.

Species: C57Bl/6

Origin: Gecertificeerde leverancier

Maximum number of animals: 624

Life stage: 10-14 weken

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
C57Bl/6	Gecertificeerde leverancier	624	10-14 weken

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

In onze *in vitro* experimenten hebben we aangetoond dat het IL37-adenovirus de hoogste expressie spiegels laat zien 2-3 dagen na transductie van humane kraakbeencellen. De expressielevels verlagen tot baseline binnen 2-4 weken na transductie. Het expressieprofiel van het IL37-adenovirus *in vitro* hebben we goed in kaart gebracht, maar we weten niets over het expressieprofiel van het IL37-adenovirus in een levend organisme en een intact gewricht. Daarnaast is *in vivo* het immuunsysteem aanwezig en is er interactie tussen verschillende weefsels van het gewricht die het expressieprofiel van het IL37-adenovirus kunnen beïnvloeden. Verder weten we ook niet hoe de muizen op het IL37-adenovirus zullen reageren, aangezien muizen zelf geen IL37 homoloog hebben en weten we niet of het adenovirus schade aanbrengt aan het gewricht. Wel weten we vanuit de literatuur dat IL37-transgene muizen geen fenotype laten zien en de muizen sterk op IL37 reageren door de ontsteking te verminderen. Omdat we maar weinig weten over het IL37-adenovirus in muizen en in een intact gewricht, is het nodig om eerst het IL37-adenovirus te valideren in muizen en zijn *in vitro* experimenten niet heel voorspelbaar. Muizen zijn de "laagste" zoogdieren met eenzelfde gewrichtspathologie en immuunsysteem als mensen en zijn daarom het beste model om te gebruiken.

Reduction

In dit project is een schatting gemaakt van het aantal dieren dat nodig is om deze studie uit te voeren. Per experiment wordt nauwkeurig bepaald of alle groepen noodzakelijk zijn om antwoord te krijgen op de vraag. In dit experiment zal bepaald worden of onze experimentele opzet die we willen toepassen in de experimentele artrosemodellen een geschikte methode is. Dit zorgt ervoor dat we zeker weten dat het IL37-adenovirus functioneel is en veilig gebruikt kan worden zonder dat het van zichzelf al schade aanricht aan het gewricht. Met deze resultaten kunnen er valide metingen gedaan worden in de experimentele artrosemodellen, waardoor voorkomen wordt dat er onnodige dieren gebruikt zullen worden in vervolg experimenten. Via de power-berekeningen zijn de groepsgroottes bepaald, en deze experimentele groepen zijn nodig om een valide antwoord te krijgen op de onderzoeksvraag. Een verdere reductie in groepsgrootte zal geen betrouwbare data opleveren en is daarom niet mogelijk. Voor het expressiepatroon van het IL37-adenovirus en Luc-adenovirus kijken we op zeven tijdstippen in de tijd naar de hoogte van de IL37 expressie levels en bestuderen we of het IL37-adenovirus schade aanbrengt aan het gewricht ten opzicht van de Luc-adenovirus. Gewrichtsschade wordt bestudeerd via drie uitkomstparameters: histologie, RNA en wash-outs. Voor iedere uitkomstmaat is synovium en kraakbeen nodig, waardoor we de verschillende uitkomstparameters niet in 1 dier kunnen onderzoeken.

Refinement

Om het IL37-adenovirus te valideren is het niet nodig om al artrose te induceren in de muizen. Daarom zullen er naïeve muizen gebruikt worden om het Luc-controle of IL37-adenovirus te injecteren. De injectie van de adenovirussen vindt plaats onder adequate verdoving en extra comfort zal geboden worden door het verstrekken van zacht nestmateriaal tijdens het herstel van de anesthesie. Verder zal dit experiment meehelpen met het verder verfijnen van vervolgentoelagen. Dagelijkse inspecties van de muizen zullen ervoor zorgen dat muizen met onverwacht ongemak juist behandeld zullen worden of waar nodig uit het experiment worden gehaald om verder ongemakken en of pijn te voorkomen.

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

De muizen zullen gehuisvest worden in groepen met verrijking van de omgeving om stress geïnduceerd-gedrag te verminderen. De adenovirus injecties zullen onder anesthesie worden toegepast om ongerief te verminderen. Om verdere welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnologisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn. Verder zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast.

In dit dierenexperiment wordt de kinetiek en basale effecten van het IL37-adenovirus bestudeerd in de muis. We gebruiken hiervoor naïve muizen, dus we passen geen artrose model toe. Verder zullen de muizen hiervoor eenmalig een adenovirus toegediend krijgen en is het een kortlopend experiment. Omdat we niet verwachten dat het IL37-adenovirus ongerief zal aanbrengen aan de muis, passen we geen maatregelen toe om negatieve effecten te minimaliseren.

In dit experiment wordt gebruik gemaakt van adenovirussen. Het afvalmateriaal zal worden afgevoerd volgens de DM-II richtlijnen, hierdoor zullen er geen negatieve effecten op de omgeving zijn.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

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.

Intra-articulaire injecties zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie.

We verwachten dat de pijn na de adenovirus injectie zeer kort en lokaal is dat pijnbestrijding na de injectie niet noodzakelijk is.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

De muizen zullen licht ongerief ondervinden door de intra-articulaire injecties onder anesthesie .

Explain why these effects may emerge.

Het zou eventueel kunnen dat injectie van het adenovirus een lichte ontsteking veroorzaakt, dit zou kunnen zorgen voor verminderde mobiliteit. Echter, wij verwachten geen schadelijke effecten van de adenovirus injecties.

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

We hebben geen preventieve maatregelen om ongemakken van de muizen te voorkomen, aangezien de misschien bijkomstige ontsteking ten gevolge van de adenovirus injecties een uitleesparameter is. Wel hebben we de algemene humane eindpunten. Verder indien de dieren ernstige ziekteverschijnselen vertonen (gekromde rug, overeind staande beharing, gewrichtsverlies) zullen de dieren voortijdig uit het experiment worden genomen via cervicale dislocatie. Dit is echter zeer onwaarschijnlijk. Verder zal het dier uit de proef worden gehaald indien er een veranderd looppatroon zichtbaar is, doordat de bewegingsbeperking zo ernstig is dat het dier niet meer normaal kan lopen. In het geval dat een muis een poot niet meer actief belast, zal deze uit de proef genomen worden, dit komt echter zeer zelden voor.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

We hanteren de algemene humane eindpunten. Verder indien de dieren ernstige ziekteverschijnselen vertonen (gekromde rug, overeind staande beharing, gewrichtsverlies) zullen de dieren voortijdig uit het experiment worden genomen via cervicale dislocatie. Dit is echter zeer onwaarschijnlijk. Verder zal het dier uit de proef worden gehaald indien er een veranderd looppatroon zichtbaar is, doordat de bewegingsbeperking zo ernstig is dat het dier niet meer normaal kan lopen. In het geval dat een muis een poot niet meer actief belast, zal deze uit de proef genomen worden, dit komt echter zeer zelden voor. Humane eindpunten zijn derhalve: ziekteverschijnselen en zeer moeilijk voortbewegen.

Indicate the likely incidence.

De kans op humane eindpunt is zeer klein. Naar alle waarschijnlijkheid kleiner dan 1%.

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).

Het verwachte niveau van discomfort is licht voor alle dieren geïncludeerd in deze DAP.

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.

Het is noodzakelijk om het dier te doden om vervolgens weefsel te kunnen verwijderen voor verdere analyse.

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

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

Yes

Appendix
Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Effect van IL37 op gewrichtsschade in het DMM-model</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Effect van IL37 op gewrichtsschade in het DMM-model
Serial number	Type of animal procedure					
2	Effect van IL37 op gewrichtsschade in het DMM-model					

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 het DMM-model wordt het ligament in de rechter knie dat de meniscus aan de mediale zijde met de tibia verbindt doorgesneden, dit zorgt voor instabiliteit van de meniscus en de gehele knie. In week 10-16 ontstaat er kraakbeenschade door gewrichtsinstabiliteit. Dit is een artrosemodel met beperkte ontsteking.

Met behulp van het IL37-adenovirus, dat intra-articulair in de knie wordt geïnjecteerd, raken we cellen in het synovium, die vervolgens tijdelijk IL37 gaan produceren. Het IL37 of Luc-controle virus zal 2-3 keer intra-articular worden ingespoten, afhankelijk van het expressieprofiel van het adenovirus (DAP 1). Hierbij zal het adenovirus worden geïnjecteerd in twee afzonderlijke experimenten in verschillende fasen van het artroseproces in het DMM-model.

- Experiment 1: Injectie van het IL37-adenovirus kort na inductie van het DMM-model. Met deze resultaten kunnen we bestuderen of IL37 in staat is om al vroeg in het artroseproces de ernst van kraakbeenschade te remmen, te vertragen of zelfs te voorkomen
- Experiment 2: Injectie van het IL37-adenovirus wanneer er gewrichtsschade is opgetreden in het DMM-model. Met deze resultaten kunnen we bestuderen of IL37 de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade kan remmen.

Bovenstaande beschreven experimenten zijn onafhankelijk van elkaar. In het eerste beschreven experiment, waarin het IL37-adenovirus vroeg in het model geïnjecteerd wordt, bestuderen we of artrose patiënten waarbij nog maar kort artrose is vastgesteld, IL37 een beschermend effect kan hebben op de initiatie van kraakbeenschade. In het tweede beschreven experiment, bestuderen we het effect van IL37 wanneer er al voor een langere tijd artrose aanwezig is en daarmee ook al meer kraakbeenschade heeft plaatsgevonden. Hierbij wordt vooral onderzocht of IL37 de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade kan remmen. In deze twee fasen van hetzelfde artrosemodel vinden verschillende processen plaats waardoor het ene model niet voorspellend is voor het andere model. Hierdoor kunnen we geen go/no go moment invoegen.

De primaire uitkomstparameter is: kraakbeenschade/kraakbeenschade-parameters

Voor het bestuderen van het effect van IL37 op kraakbeenschade in het DMM-model, zullen de muizen op verschillende tijdstippen na het inzetten van de proef geofferd worden. Er zullen weefsels geïsoleerd worden voor histologie, RNA en wash-outs. Op histologie kunnen we structurele veranderingen aan het gewricht vaststellen met behulp van de gemodificeerde OARSI score [1]. Dit is een score voor artrotische veranderingen in het kraakbeen, zoals fibrillaties, scheurtjes en verlies van kraakbeen alsmede de uitgebreidheid daarvan. Op RNA niveau kunnen we de kwaliteit van het kraakbeen bestuderen op productie van ontstekingsmarkers zoals IL1 β , IL6 en IL8 en matrix afbrekende enzymen zoals matrix metalloproteinasen (MMPs) en a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motifs (ADAMTSs).

Wash-outs zullen worden verkregen door het weefsel uit het gewricht in kweek te zetten, waardoor ze signaalmoleculen, zoals ontstekingsfactoren of matrix afbrekende enzymen, zullen uitscheiden wat ze normaal ook in het gewricht zouden hebben gedaan. Door dit materiaal te verzamelen kunnen we de kraakbeenafbrekende processen op eiwitniveau bestuderen bijvoorbeeld met behulp van de Multiplex Elisa (Luminex).

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

In het DMM-model wordt in de rechter knie het ligament waarmee de mediale meniscus in de knie aangehecht zit aan het bot doorgesneden onder volledige anesthesie. In dit model zal er eerst kraakbeenschade optreden aan de mediale zijde en later in het model ook de laterale zijde. Dit model zal 20 weken duren. Op basis van ervaring uit eerdere experimenten met DMM-modellen weten we dat 20 weken voldoende zijn om kraakbeenschade te induceren.

Binnen het DMM-model zullen we twee experimenten uitvoeren.

1. Injectie van het IL37-adenovirus vroeg na inductie van het DMM-model, bijvoorbeeld dag 5. Dit om te onderzoeken of vroege toediening van IL37 leidt tot minder en vertraagde inductie van kraakbeenschade naar mate het model vordert. Met deze proef kunnen we aantonen of we kort na trauma al profylactisch IL37 zouden moeten toedienen om latere gewrichtsschade te voorkomen. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit doelstelling 1, waarin we bestuderen hoe lang de IL37 levels aanwezig blijven in het gewricht. Maximale frequentie van injectie is 10 keer om immunoreacties te voorkomen.
2. Injectie van het IL37-adenovirus nadat er al echte gewrichtsschade aanwezig is in het DMM-model, bijvoorbeeld week 4. Dit om te onderzoeken of IL37 ook in staat is om de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade te remmen. Met deze proef kunnen we aantonen of het zinvol is om patiënten te behandelen wanneer er al milde schade is ontstaan. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit doelstelling 1.

In beide experimenten zal er op drie korte tijdstippen, vlak na injectie van het IL37 adenovirus of Luc adenovirus weefsels worden geïsoleerd (bijvoorbeeld dag 1, 3 en 7) om te bevestigen dat de IL37 overexpressie is gelukt en om te kijken naar de ontsteking. Daarnaast zal er op vier latere tijdstippen weefsel worden geïsoleerd om het effect van IL37 op gewrichtsschade te bestuderen tot maximaal 20 weken. Voor experiment 1 zal dit bijvoorbeeld rond week 4, 8, 16 en 20 zijn; en voor experiment 2 zal dit bijvoorbeeld week 8, 10, 16 en 20 zijn.

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt. Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt: $n = 1 + 2C(s/d)^2$.

De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power ($1-\beta$) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde. De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleid worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data.

Uitgaande van eerdere experimenten met het DMM-model en de variatie tussen de read-out parameters gaan we uit van een standaard deviatie van 15 en een verschil van 20%, wat neerkomt op een n-waarde van 9,8. Dus afgerond 10 muizen per groep. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken, aangezien dit mogelijk een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten.

Daarom is besloten tot aparte controle muizen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

B. The animals

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

Species: Kraakbeen is een zeer complex weefsel dat interacties aangaat met andere weefsels in het gewricht, zoals het synovium en functioneert onder invloed van belasting. Onderzoek naar kraakbeen kan daarom het beste uitgevoerd worden in een modelsysteem waarbij het kraakbeen in zijn natuurlijke omgeving blijft in een vergelijkbaar functionerend gewricht als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een vergelijkbare interactie tussen de weefsels in het gewricht als de mens en met een vergelijkbaar immuunsysteem en zijn daarom het beste geschikte model om artrose in te onderzoeken.

We zullen gebruik maken van de C57Bl/6 muizen en geven de voorkeur aan mannelijke muizen. De OA pathologie tussen mannetjes en vrouwtjes muizen is hetzelfde, hierdoor gelden de conclusies die getrokken worden uit de experimenten uitgevoerd in het mannelijk geslacht ook voor het vrouwelijk geslacht. **Argumentatie om dit model uit te voeren in mannelijke muizen komt voort uit de literatuur. In de literatuur is in 2007 het volgende artikel verschenen van Glasson SS *et al.*: "Osteoarthritis severity is sex dependent in a surgical mouse model" (Osteoarthritis and Cartilage, 2007). In deze studie wordt laten zien dat mannelijke muizen significant 'more severe' artrose ontwikkelen dan vrouwelijke muizen op alle tijdpunten van het zogeheten DMM-model. Mannelijke muizen laten hierbij extensieve fibrillatie zien, tidemark erosie en verlies van proteoglycanen, terwijl de effecten van dit model in vrouwelijke muizen zich beperken tot oppervlakkige fibrillatie en lokaal proteoglycaan verlies. De vrouwelijke muizen van verschillende strains laten sterke bescherming zien tegen dit artrosemodel, waardoor artrose zich niet of met mate ontwikkelt. Hierdoor is het moeilijk het effect van IL37, waarvan we verwachten dat het een beschermend effect heeft op artrose, te onderzoeken op het moment dat er bijna geen artrose plaatsvindt. Verder wordt de keuze voor het DMM-model in mannelijke muizen ondersteund vanuit de literatuur. Recent gepubliceerde studies waarin het DMM-model is toegepast door verschillende onafhankelijke onderzoeksgroepen, zijn allemaal uitgevoerd in mannelijke muizen. Voorbeelden van deze publicaties zijn:**

1. Rachel E. Miller, Shingo Ishihare *et al.* Chemogenetic inhibition of pain neurons in a mouse model of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatology*, 2017
2. Oscar Alvarez-Garcia, Tokio Matsuzaki *et al.* Regulated in development and DNA Damage Response 1 Deficiency impairs autophagy and mitochondrial biogenesis in articular cartilage and increases the severity of experimental osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatology*, 2017.
3. P. Das Neves Borges, T. Vincent *et al.* Automated assessment of bone changes in cross-sectional micro-CT studies of murine experimental osteoarthritis. *PloS One*, 2017.
4. Averi Gibson, Carrie Mingalone *et al.* Wnt7a inhibits IL-1 β induced catabolic gene expression and prevents articular cartilage damage in experimental osteoarthritis. *Scientific Reports*, 2017.
5. F Veronesi, G Giavaresi *et al.* Chondroprotective activity of N-acetyl phenylalanine glucosamine derivative on knee joint structure and inflammation in a murine model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2017.

6. Miotla Zarebska, Chanalaris A *et al.* CCL2 and CCR2 regulate pain-related behavior and early gene expression in post-traumatic murine osteoarthritis but contribute little to chondropathy. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2017.
7. A Latourte A, C Cherifi *et al.* Systemic inhibition of IL-6/Stat3 signalling protects against experimental osteoarthritis. *Annals of Rheumatic Diseases*, 2016.
8. W Choi and J Chun. Upregulation of lipocalin-2 (LCN2) in osteoarthritic cartilage is not necessary for cartilage destruction in mice. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2017.
9. Neng-Yu Lin, Alfiya Distler *et al.* Inhibition of Notch1 promotes hedgehog signaling in a HES1-dependent manner in chondrocytes and exacerbates experimental osteoarthritis. *Annals of Rheumatic Diseases*, 2016.
10. NH Lim, TL Vincent *et al.* In vivo optical imaging of early osteoarthritis using an antibody specific to damaged arthritis cartilage. *Arthritis Research and Therapy*, 2015.

Gebaseerd op de studie uit 2007 van Glasson *et al.* die aantoont dat de DMM-artrose maar matig ontwikkelt in vrouwelijke muizen en de recente publicaties die zijn verschenen waarin het DMM-model alleen uitgevoerd is in mannelijke muizen, hebben we besloten om onze experimenten beschreven in DAP2 (bijlage 3.4.4.2) alleen uit te voeren in mannelijke muizen. Hierdoor voorkomen we dat we onnodig veel muizen hoeven te gebruiken, die wetenschappelijk gezien geen extra inzicht zouden geven in het effect van IL37 op de experimentele artrose geïnduceerd door het DMM-model, door het ontbreken van een therapeutisch window. Door het gebruik van mannelijke muizen is de variatie binnen de groepen kleiner dan wanneer we vrouwelijke muizen zouden gebruiken, waardoor we minder grote groepen muizen nodig hebben om een significant resultaat te kunnen behalen, wat we ethisch verantwoord vinden. Wel weten we dat mannelijke muizen eerder de neiging hebben om te vechten dan vrouwelijke muizen. Hiermee is rekening gehouden in de berekening van de grootte van de experimentele groepen. Verder worden er maatregelen getroffen om de kans op vechten te minimaliseren, zoals voorkomen dat de muizen herverdeeld worden en er wordt gebruik gemaakt van lavendelspray. We hopen hiermee zo optimaal mogelijk te voldoen aan vermindering en verfijning.

Age range: Jong-volwassen muizen, 10-14 weken oud.

Origin: Gecertificeerde leverancier zoals Janvier, Jackson of Charles River

Estimated number of animals: Maximaal 882 muizen gebaseerd op de twee experimenten die we in het DMM-model zullen uitvoeren, met in ieder experiment twee experimentele groepen (1: Luc-controle en 2: IL37-adenovirus behandelde groep) en per groep een schatting van 10 muizen per groep, voor ieder van de 3 verschillende read-out parameters (Histologie, RNA, wash-outs) op maximaal 7 verschillende tijdstippen.

In verband met mogelijke uitval in dit experiment voegen we 5% extra muizen toe (42 muizen), wat komt op een totaal van 882 muizen.

Deze uitval kan optreden door het risico van narcose. In enkele experimenten in het verleden is het wel eens voorgekomen dat 1 a 2 muizen overleden tijdens en na narcose. Dit was ongeveer 5% van de totale hoeveelheid gebruikte muizen.

Species: C57Bl/6

Origin: Gecertificeerde Leverancier

Maximum number of animals: 882

Life stage: 10-14 weken

Referentie:

1. Ma HL et al. Osteoarthritis is sex dependent in a surgical mouse model. Osteoarthritis and Cartilage 2007. 15(6):695-700

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
C57Bl/6	Gecertificeerde Leverancier	882	10-14 weken

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

Artrose is een proces waarin een samenspel plaatsvindt tussen de verschillende weefsels in het gewricht. Daarom zijn *in vitro* experimenten niet het meest geschikte model om het proces van artrose te bestuderen. Kraakbeenschade wordt namelijk beïnvloed door het onderliggende bot, en het synovium dat factoren uitscheidt die ook het kraakbeen bereiken. Daarnaast is het kraakbeen ook afhankelijk van belasting, die bijvoorbeeld ontstaat bij beweging. Zonder beweging worden signaalroutes uitgeschakeld, die het kraakbeen normaal gesproken in stand houden. Daarom is er op dit moment helaas geen alternatief voor het bestuderen van artrose. Muizen zijn de "laagste" zoogdieren die artrose in het gewricht ontwikkelen op een vergelijkbare manier als de mens en waarin het proces van kraakbeenschade dus ook het beste bestudeerd kan worden.

-

Reduction

In dit project is er gebruik gemaakt van een power-berekening om het juiste aantal dieren dat nodig is om deze studie uit te voeren te berekenen. Per experiment wordt er nauwkeurig gekeken of alle groepen noodzakelijk zijn om antwoord te geven op de vraag. De beschreven experimenten en tijdstippen kunnen worden aangepast afhankelijk van het experiment waarin we het expressieprofiel van het IL37-adenovirus gaan bestuderen. Dit zou kunnen leiden tot minder tijdstippen waarop weefsels geïsoleerd moeten worden. Op basis van de power-berekening, is dit aantal muizen echt nodig om valide antwoorden te krijgen op onze onderzoeksvraag. Een verder verminderde van het aantal muizen, is dus niet verantwoord.

Refinement

-

Het DMM-model zal artrose induceren in het gewricht van de muizen, waardoor de muizen mogelijk pijn zullen ervaren. Pijn is een functioneel aspect van artrose en zal invloed hebben de belasting van het gewricht en daarmee ook op het ontstaan van de pathologie. Gezien de bijdrage van ontsteking aan het artroseproces zijn middelen die ontsteking beïnvloeden onverenigbaar met de proef.

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

De muizen zullen gehuisvest worden in groepen met verrijking van de omgeving om stress geïnduceerd-gedrag te verminderen. De operatie en injecties zullen onder anesthesie worden toegepast om ongerief te verminderen. Om verdere welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnologisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn. Verder zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast. In dit experiment wordt gebruik gemaakt van adenovirussen. Het afvalmateriaal zal worden afgevoerd volgens de DM-II richtlijnen, hierdoor zullen er geen negatieve effecten op de omgeving zijn.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Inductie van de artrosemodellen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie. Pijnbestrijding zal plaatsvinden intra-operatief en er zal ook pijnbestrijding plaats vinden tot maximaal twee dagen na operatie. Ook de intra-articulaire injecties met de adenovirussen zullen plaats vinden onder volledige anesthesie. Tijdens de ontwikkeling van artrose zal er geen pijnbestrijding plaats vinden, omdat dit effect kan hebben op het verloop van het artroseproces.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Muizen kunnen matig ongerief oplopen door (de injecties onder) anesthesie en operatie. Verder zullen ze matig ongerief ondervinden door de artrose die ze zullen ontwikkelen, waardoor er een geringe kans is dat de muis door de artrose de aangedane poot niet goed meer kan belasten en daardoor verminderde mobiliteit vertoont.

Explain why these effects may emerge.

Het kan zijn dat de muis ongerief ondervindt ten gevolge van (wakker worden uit) anesthesie. De oorzaak van het ongerief is de artrose die zal ontwikkelen, hierdoor is de kans aanwezig dat de muis de aangedane poot minder zal belasten en daardoor verminderde mobiliteit vertoont.

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

We hebben geen preventieve maatregelen, omdat het essentieel is dat de muizen artrose ontwikkelen. Wel hebben we humane eindpunten. Indien de dieren ernstige ziekteverschijnselen vertonen (gekromde rug, overeind staande beharing, gewrichtsverlies) zullen de dieren voortijdig uit het experiment worden genomen via cervicale dislocatie. Dit is echter zeer onwaarschijnlijk. Verder zal het dier uit de proef worden gehaald indien er een veranderd looppatroon zichtbaar is, doordat de bewegingsbeperking zo ernstig is dat het dier niet meer normaal kan lopen. In het geval dat een muis een poot niet meer actief belast, zal deze uit de proef worden genomen, dit komt echter zeer zelden voor. Om pijn tijdens behandelingen te voorkomen zal er volledige anesthesie worden toegepast bij bijvoorbeeld intra-articulaire injecties en operaties.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

We hanteren de algemene humane eindpunten. Verder als een muis de aangedane poot niet meer kan belasten en als gevolg hiervan een verminderde mobiliteit vertoont, zal de muis uit de proef worden gehaald. Humane eindpunten zijn: ziekteverschijnselen en zeer moeilijk voortbewegen.

Indicate the likely incidence.

De kans op humaan eindpunt is zeer klein, naar alle waarschijnlijkheid veel kleiner dan 2%.

K. Classification of severity of procedures

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

Het verwachte level van ongerief is matig voor alle dieren.

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.

Het is noodzakelijk om het dier te doden om vervolgens weefsels te kunnen isoleren voor verdere analyse.

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

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

Yes

Appendix**Description animal procedures**

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 3	Type of animal procedure Effect van IL37 op gewrichtsschade in het CiOA-model

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 het CiOA-model wordt schade aan ligamenten aangebracht, door maximaal 3x intra-articulair collagenase te injecteren in de rechterknie. Dit zorgt ervoor dat het gewricht instabiel wordt er schade optreedt. Het grote verschil met het DMM-model is dat er bij het CiOA-model een grote ontstekingscomponent betrokken is. Na offeren zal weefsel geïsoleerd worden om kraakbeenschade vast te stellen.

Met behulp van het IL37-adenovirus raken we cellen in het synovium, die vervolgens IL37 gaan produceren. Het IL37 of Luc-controle adenovirus zal 2-3 keer inter-articulair worden ingespoten, afhankelijk van het expressie profiel van het adenovirus (DAP 1). Hierbij zal het adenovirus in twee afzonderlijke experimenten in verschillende fasen van het artrose proces in het CiOA-model.

- Experiment 1: Injectie van het IL37- of Luc-adenovirus kort na inductie van het CiOA-model. Met deze resultaten kunnen we bestuderen of IL37 in staat is om al vroeg in het artroseproces de ernst van kraakbeenschade te remmen, te vertragen of zelfs te voorkomen
- Experiment 2: Injectie van het IL37 of Luc adenovirus wanneer er zichtbare gewrichtsschade is opgetreden in het CiOA-model. Met deze resultaten kunnen we bestuderen of IL37 de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade kan remmen.

Bovenstaande beschreven experimenten zijn onafhankelijk van elkaar. In het eerste beschreven experiment, waarin het IL37-adenovirus vroeg in het model geïnjecteerd wordt, bestuderen we of artrose patiënten waarbij nog maar kort artrose is vastgesteld, IL37 een beschermend effect kan hebben op de initiatie van kraakbeenschade. In het tweede beschreven experiment, bestuderen we het effect van IL37 wanneer er al voor een langere tijd artrose aanwezig is en daarmee ook al meer kraakbeenschade heeft plaatsgevonden. Hierbij wordt vooral onderzocht of IL37 de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade kan remmen. In deze twee fasen van hetzelfde artrosemodel vinden verschillende processen plaats waardoor het ene model niet voorspellend is voor het andere model. Hierdoor kunnen we geen go/no go moment invoegen.

De primaire uitkomstparameter is: kraakbeenschade

Voor het bestuderen van het effect van IL37 op kraakbeenschade in het CiOA-model, zullen de muizen op verschillende tijdstippen na het inzetten van de proef geofferd worden. Er zullen weefsels geïsoleerd worden voor histologie, RNA en wash-outs. Op histologie kunnen we structurele veranderingen aan het gewricht vaststellen met behulp van de gemodificeerde OARSI score [1]. Dit is een score voor artrotische veranderingen in het kraakbeen, zoals fibrillaties, scheurtjes en verlies van kraakbeen alsmede de uitgebreidheid daarvan. Op RNA niveau kunnen we de kwaliteit van het kraakbeen bestuderen op productie van ontstekingsmarkers zoals IL1 β , IL6 en IL8 en matrix afbrekende enzymen zoals matrix metalloproteinases (MMPs) en a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTSs).

Wash-outs zullen worden verkregen door het weefsel uit het gewricht een bepaalde tijd in kweek te zetten, waardoor ze signaalmoleculen, zoals ontstekingsfactoren of matrix afbrekende enzymen, zullen uitscheiden wat ze normaal ook in het gewricht zouden hebben gedaan. Door dit materiaal te verzamelen kunnen we de kraakbeenafbrekende processen op eiwitniveau bestuderen, bijvoorbeeld met behulp van de Luminex.

Pritzker K, Gay S. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis and Cartilage* 2006 15(1):13-29

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

Bij het CiOA-model wordt er maximaal 3x intra-articulair collagenase ingespoten in de rechterknie onder isofluraan voor anesthesie. Het aantal injecties wordt bepaald naar aanleiding van de artrose die gemeten is in de meest recente uitvoering van het CiOA-model en de daarbij gebruikte dosis. Het slapper worden van de ligamenten zorgt ervoor dat het gewricht instabiel wordt en er ontsteking optreedt die vergelijkbaar is met humane artrose met ontsteking. Rond week 6-8 ontstaat er kraakbeenschade.

Binnen het CiOA-model zullen we twee experimenten uitvoeren.

1. Injectie van het IL37-adenovirus vroeg na inductie van het CiOA-model, bijvoorbeeld dag 5. Dit om te onderzoeken of vroege toediening van IL37 instaat is om de geïnduceerde ontsteking te temperen en leidt tot minder en vertraagde kraakbeenschade naar mate het model vordert. Met deze proef kunnen we aantonen of we kort na inductie van ontsteking aan het gewricht, door bijvoorbeeld knieletsel, al profylactisch IL37 zouden moeten toedienen om latere gewrichtsschade te voorkomen. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit DAP 1.
2. Injectie van het IL37-adenovirus nadat er al beginnende schade zichtbaar is in het CiOA-model, bijvoorbeeld week 4. Dit om te onderzoeken of IL37 ook in staat is om de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade te remmen in een artrose model met ontsteking. Met deze proef kunnen we aantonen of het zinvol is om patiënten te behandelen wanneer er al beginnende schade is ontstaan. De frequentie en timing wordt bepaald aan de hand van de resultaten uit DAP 1.

In beide experimenten zal er op drie korte tijdstippen, vlak na injectie van het IL37 adenovirus of Luc adenovirus weefsels worden geïsoleerd (bijvoorbeeld dag 1, 3 en 7) om te bevestigen dat de IL37 overexpressie is gelukt en om te kijken naar de ontsteking. Daarnaast zal er op vier latere tijdstippen weefsel worden geïsoleerd om het effect van IL37 op gewrichtsschade te bestuderen tot maximaal 20 weken. Voor experiment 1 zal dit bijvoorbeeld rond week 4, 8, 16 en 20 zijn; en voor experiment 2 zal dit bijvoorbeeld week 8, 10, 16 en 20 zijn.

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

Om het juiste aantal benodigde dieren (n) te bepalen waarbij statistisch betrouwbare data wordt verkregen, zal gebruik worden gemaakt van een power analyse waarbij een formele hypothese wordt getoetst met continue variabelen. Deze analyse zorgt ervoor dat er geen onnodig hoge aantallen muizen per groep zullen worden gebruikt. Hierbij zal de volgende formule worden gebruikt: $n = 1 + 2C(s/d)^2$.

De C-waarde wordt berekend m.b.v. van de power ($1-\beta$) en het gewenste significantieniveau (α). Wanneer twee groepen (controle en experimenteel) met elkaar vergeleken dienen te worden zal een power van 0,8 en een significantieniveau van 0,05 gebruikt worden, dit resulteert in een C-waarde van 7,85. Als er meer dan twee groepen met elkaar vergeleken dienen te worden zal een Bonferroni correctie worden toegepast, hierbij zal het significantieniveau verlaagd worden, welke zal leiden tot een verhoging van de C-waarde. De s- en d-waarde staan voor de geschatte standaard deviatie (s) en de verwachte mate van verschil tussen controle en experimentele groep (d). Deze waarden zullen herleid worden uit eerder uitgevoerde (pilot-) experimenten of reeds gepubliceerde data.

Uitgaande van eerdere experimenten met CiOA-model gaan we uit van een standaard deviatie van 15 en een verschil van 20%, wat neerkomt op een n-waarde van 9,8. Dus afgerond 10 muizen per groep. Er is bewust gekozen om de niet geïnjecteerde linkerknie niet als controle te gebruiken,

aangezien dit een onbetrouwbare controle zal zijn door systemische effecten. Daarom is besloten tot aparte controle muizen, dit zal niet leiden tot minder dieren, maar wel voorkomen dat experimenten herhaald dienen te worden met als gevolg het gebruik van onnodig veel dieren.

B. The animals

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

Species: Kraakbeen is een zeer complex weefsel dat interacties aangaat met andere weefsels in het gewricht, zoals het synovium en functioneert onder invloed van belasting. Onderzoek naar kraakbeen kan daarom alleen uitgevoerd worden in een modelsysteem waarbij het kraakbeen in zijn natuurlijke omgeving blijft in een vergelijkbaar functionerend gewricht als de mens. Muizen zijn de "laagste" vertebraten met een vergelijkbare interactie tussen de weefsels in het gewricht als de mens en met een vergelijkbaar immuunsysteem en zijn daarom het beste geschikte model om artrose in te onderzoeken.

We zullen gebruik maken van de C57Bl/6 muizen en geven de voorkeur aan vrouwelijke muizen. De OA pathologie tussen het mannelijk en vrouwelijk geslacht zijn hetzelfde. Hierdoor gelden conclusies die we verkrijgen uit de experimenten met het vrouwelijke geslacht ook voor het mannelijke geslacht.

Echter, uit eigen ervaring van onze diermodellen en gebaseerd op de literatuur is bekend dat mannelijke muizen vaker vechten. In 2013 is een publicatie verschenen van Meakin Lee *et al.*, genaamd: "Male mice housed in groups engage in frequent fighting and show a lower response to additional bone loading than females or individually housed males that do not fight" (Bone, 2013). In deze publicatie hebben ze de observatie gedaan dat mannelijke muizen betrokken zijn bij gevechten 1.3 keer per uur, terwijl vrouwelijke muizen niet vechten. Het vechten van de mannelijke muizen heeft hun onderzoeksresultaten beïnvloedt. Wat wij ervaren hebben uit onze dierexperimenten, is dat het vechten van mannelijke muizen resulteert in veel dislocaties van het kniegewricht. Wanneer er dislocaties optreden, is het niet verantwoord om de muizen in het experiment te laten, waardoor we de muizen vanwege ethische redenen uit het experiment halen. Hierdoor bestaat de kans dat de grote van onze muizengroepen te klein wordt om een statistisch significant resultaat te behalen. Verder is het beleid dat wanneer de muizen vechten, de vechter apart moet worden gezet wat weer invloed heeft op de ontwikkeling van artrose.

Wanneer we mannelijke muizen zouden gebruiken zouden we veel muizen vroegtijdig uit onze experimenten moeten halen vanwege de dislocaties, waardoor we vanaf het begin grote experimentele groepen van muizen nodig hebben om nog betrouwbare conclusies te kunnen trekken uit onze resultaten. Vanwege het hoge aantal mannelijke muizen dat we voor dit model nodig zouden hebben en het ongerief dat dit met zich meebrengt, hebben we gekozen voor optimale verfijning van het experiment en besloten om DAP3 (bijlage 3.4.4.3) alleen in vrouwelijke muizen uit te voeren.

Age range: Jong-volwassen muizen, 10-14 weken muizen.

Origin: Gecertificeerde leverancier zoals Janvier, Jackson of Charles River

Estimated number of animals: Maximaal 882 muizen gebaseerd op de twee experimenten die we in het CiOA-model zullen uitvoeren, met in ieder experiment twee experimentele groepen (1: Luc-controle en 2: IL37-behandelde groep) en per groep een schatting van 10 muizen per groep, voor ieder van de 3 verschillende read-out parameters (Histologie, RNA, wash-outs) op maximaal 7 verschillende tijdstippen.

In verband met mogelijke uitval in dit experiment voegen we 5% extra muizen toe (42 muizen), wat komt op een totaal van 882 muizen. Deze uitval is gebaseerd op patella dislocaties die kunnen optreden bij dit model. Dit percentage is gebaseerd op een eerder experiment waarbij in de collagenase behandelde groep muizen dislocaties optraden. Dit was ongeveer 5% van de totale hoeveelheid gebruikte muizen.

Species: C57Bl/6

Origin: Gecertificeerde Leverancier

Maximum number of animals: 882

Life stage: 10-14 weken

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
C57Bl/6	Gecertificeerde Leverancier	882	10-14 weken

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

Artrose is een proces waarin een samenspel plaatsvindt tussen de verschillende weefsels in het gewricht. Daarom zijn *in vitro* experimenten niet het meest geschikte model om het proces van artrose te bestuderen. Kraakbeenschade wordt namelijk beïnvloedt door het onderliggende bot, en het synovium dat factoren uitscheidt die ook het kraakbeen bereiken. Daarnaast is het kraakbeen ook afhankelijk van belasting, die bijvoorbeeld ontstaat bij beweging. Zonder beweging worden signaalroutes uitgeschakeld, die het kraakbeen normaal gesproken in stand houden. Daarom is er op dit moment helaas geen alternatief voor het bestuderen van artrose. Muizen zijn de "laagste" zoogdieren die artrose in het gewricht ontwikkelen op een vergelijkbare manier al de mens en waarin het proces van kraakbeenschade dus ook het beste bestudeerd kan worden.

Reduction

In dit project is er gebruik gemaakt van een power-berekening om het juiste aantal dieren dat nodig is om deze studie uit te voeren te berekenen. Per experiment wordt er nauwkeurig gekeken of alle groepen noodzakelijk zijn om antwoord te geven op de vraag. De beschreven experimenten en tijdstippen kunnen worden aangepast afhankelijk van het experiment waarin we het expressieprofiel van het IL37-adenovirus gaan bestuderen. Dit zou kunnen leiden tot minder tijdstippen waarop weefsels geïsoleerd moeten worden. Op basis van de power-berekening, is dit aantal muizen echt nodig om valide antwoorden te krijgen op onze onderzoeksvraag. Een verder verminderde van het aantal muizen, zou kunnen leiden tot herhaling van experimenten waardoor er juist weer extra muizen gebruikt zouden moeten worden.

Refinement

Het CiOA-model zal artrose induceren in het gewricht van de muizen, waardoor de muizen pijn zullen ervaren. Pijn is een functioneel aspect van artrose en zal invloed hebben op de belasting van het gewricht en daarmee ook op het ontstaan van de pathologie. Gezien de bijdrage van ontsteking aan het artroseproces zijn middelen die ontsteking beïnvloeden onverenigbaar met de proef.

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

De muizen zullen gehuisvest worden in groepen met verrijking van de omgeving om stress geïnduceerd-gedrag te verminderen. De injecties zullen onder anesthesie worden toegepast om ongerief te verminderen. Om verdere welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam biotechnologisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn. Verder zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast.

In dit experiment wordt gebruik gemaakt van adenovirussen. Het afvalmateriaal zal worden afgevoerd volgens de DM-II richtlijnen, hierdoor zullen er geen negatieve effecten op de omgeving zijn.

Repetition and Duplication

E. Repetition

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

Not applicable

Accommodation and care

F. Accommodation and care

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

No

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

G. Location where the animals procedures are performed

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

Classification of discomfort/humane endpoints

H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

Inductie van de artrose modellen zullen worden uitgevoerd onder volledige anesthesie, verder zal er geen analgesie worden toegepast. Ook de intra-articulaire injecties met de adenovirussen zullen plaats vinden onder volledige anesthesie. Tijdens de ontwikkeling van artrose zal er geen pijnbestrijding plaats vinden, omdat dit effect kan hebben op het verloop van het artrose proces.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Muizen kunnen matige ongerief oplopen door de injecties van de anesthesie. Verder zullen ze matig ongerief ondervinden door de artrose die ze zullen ontwikkelen, waardoor er een geringe kans is dat de muis door de artrose de aangedane poot niet goed meer kan belasten en daardoor verminderde mobiliteit vertoont.

Explain why these effects may emerge.

Er zal ongerief zijn door ontwaken uit anesthesie. De oorzaak van het ongerief is de artrose die zal ontwikkelen, hierdoor is de kans aanwezig dat de muis de aangedane poot minder zal belasten en daardoor verminderde mobiliteit vertoont.

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

Er zullen geen preventieve maatregelen worden toegepast, omdat het essentieel is dat de muizen artrose ontwikkelen. We passen wel humane eindpunten toe. Indien de dieren ernstige ziekteverschijnselen vertonen (gekromde rug, overeind staande beharing, gewrichtsverlies) zullen de dieren voortijdig uit het experiment worden genomen via cervicale dislocatie. Dit is echter zeer onwaarschijnlijk. Verder zal het dier uit de proef worden gehaald indien er een veranderd looppatroon zichtbaar is, doordat de bewegingsbeperking zo ernstig is dat het dier niet meer normaal kan lopen. In het geval dat een muis een poot niet meer actief belast, zal deze uit de proef worden genomen, dit komt echter zeer zelden voor. Om pijn tijdens behandelingen te voorkomen zal er volledige anesthesie worden toegepast bij bijvoorbeeld intra-articulaire injecties.

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.

De algemene humane eindpunten zullen worden toegepast. Als een muis de aangedane poot niet meer kan belasten en als gevolg hiervan een verminderde mobiliteit vertoont, zal de muis uit de proef worden gehaald. Humane eindpunten zijn: ziekteverschijnselen en zeer moeilijk voortbewegen.

Indicate the likely incidence.

De kans op humaan eindpunt is zeer klein, naar alle waarschijnlijkheid veel kleiner dan 2%.

K. Classification of severity of procedures

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

Het verwachte level van ongerief is voor alle geïnccludeerde muizen 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.

Het is noodzakelijk om het dier te doden om vervolgens weefsels te kunnen isoleren voor verdere analyse.

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

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

Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2017-0012
2. Titel van het project: Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?
3. Titel van de NTS: Kan de anti-ontstekingsstof Interleukine-37 (IL37) de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 12-04-2017
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 02-05-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 08-05-2017 tot 15-05-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 15-05-2017
 - advies aan CCD: 01-06-2017
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum vragen: 08-05-2017
 - Datum antwoorden: 15-05-2017
 - Gestelde vragen en antwoorden:

General information:

-2.1: De Commissie is van mening dat het niet alleen basic research betreft.

Antwoord: Met het projectvoorstel dat geschreven is, willen we inderdaad een klinische toepassing vinden voor IL37 om hiermee artrose patiënten te behandelen. Echter, het toedienen van IL37 middels een adenovirus heeft nog niet direct een klinische toepassing voor artrose patiënten, omdat tot op heden een adenovirus kan zorgen voor veel risico's en complicaties waardoor het nog niet veilig is voor de patiënt om deze methode te gebruiken. Mocht er uit deze dierstudie komen dat IL37 een potente therapie kan zijn voor artrose patiënten, dan gaan we zeker op zoek naar een vorm van therapie waarin we IL37 kunnen toepassen, bijvoorbeeld middels een "small molecule" die homolog is aan IL37 functie. Omdat er toch een klein

translationeel component in het projectvoorstel beschreven is, is er voor de zekerheid naast basic research ook translational and applied research aangekruist.

Project Proposal:

-3.1: Er worden twee diermodellen voor artrose gebruikt om het effect van IL37 op artrose te bestuderen. Waarom wordt IL37 toegepast in een model dat zich kenmerkt door minimale ontsteking, terwijl dit molecuul juist een ontstekingsremmend effect heeft? Uit de beschreven achtergrond van de projectaanvraag komt dit niet duidelijk naar voren (later wel maar de commissie adviseert dit al onder 3.1 uit te leggen).

Antwoord: IL37 is bekend geworden als een stof dat ontsteking kan onderdrukken in veel experimentele ziektemodellen die gepaard gaan met ontsteking. Echter, wij hebben met onze in vitro studies aangetoond dat IL37 in kraakbeen stukjes niet alleen een ontstekingsremmend effect heeft, maar dat het ook de functie van kraakbeenafbrekende enzymen kan remmen die aanwezig zijn bij artrose en via deze weg een direct effect heeft op kraakbeen. Hierdoor zou IL37 niet alleen beschermend werken tegen artrose dat gepaard gaat met grote ontsteking maar zou IL37 ook beschermend werken in een model waar minimale ontsteking aanwezig is maar wel de kraakbeenafbrekende enzymen aanwezig zijn. Als reactie hierop hebben we dit extra benadrukt onder 3.1 (zie blauw-gedrukte tekst).

-3.1: De commissie ziet net als de aanvragers ook een translationele component in dit onderzoek: 'Deze proeven zullen inzicht verschaffen in welk type artrose IL37 een belangrijke therapeutische rol kan spelen' (laatste zin onderdeel 3.1). Waarom hebben de aanvragers alleen basaal onderzoek aangekruist?

Antwoord: In het projectvoorstel is alleen basic research aangekruist, omdat een directe klinische toepassing voor IL37 met een adenovirus niet het meest waarschijnlijke is in artrose patiënten. Adenovirussen en daarmee ook gentherapie brengt veel risico's met zich mee en is daarom nog niet veilig om in patiënten te gebruiken. Echter, zoals ook in de reactie op commentaar 2.1 is beschreven, mocht er uit de dierstudies die beschreven zijn in dit projectvoorstel komen dat IL37 therapie zeer potent is, gaan we wel op zoek naar een vorm van therapie waarin we IL37 kunnen toepassen in artrose patiënten, bijvoorbeeld middels een "small molecule" die homoloog is aan IL37 functie. Omdat er toch een klein translationeel component in het projectvoorstel beschreven is, is er voor de zekerheid naast basic research ook translational and applied research aangekruist.

-3.1: Het translationele aspect van de studie (evaluatie van het therapeutische effect van inspuiten van het IL37-adenovirus in het aangedane kniegewricht) is nog niet goed beschreven in de inleiding. Is het bijvoorbeeld mogelijk om een adenovirus te gebruiken bij patiënten?

Antwoord: Wij hopen uit deze dierproeven te kunnen bepalen welk type artrose in patiënten behandeld zou kunnen worden met IL37. Het mooiste zou zijn om het IL37-adenovirus in te kunnen spuiten in het aangedane kniegewricht van artrose patiënten. Ondanks er meer successen komen uit onderzoeken met gentherapie, zijn er ook nog steeds gevaren van het gebruik van adenovirussen en is het nog niet veilig om adenovirussen in patiënten te gebruiken. Een andere optie voor het translationele aspect van deze studie, is om na bevestiging dat IL37 beschermend werkt tegen artrose een small-molecule te ontwikkelen dat homoloog is aan IL37. "Small molecules" kunnen effectieve weefsels penetreren en op de juiste plaats in het kniegewricht

terecht komen om de progressie van artrose te remmen. Een andere mogelijkheid zou zijn om een methode toe te passen die ervoor zorgt dat er langdurige afgifte is van het IL37 molecuul, zodat de beschermende effecten ook langdurig zouden werken. Als reactie hierop is het translationale aspect van deze studie verder uitgewerkt (zie dikgedrukte tekst).

-3.2: Recente literatuurverwijzingen in aanvulling op deze oude papers zouden de onderbouwing van de huidige haalbaarheid versterken.

Antwoord: De literatuurverwijzingen naar de bekendheid van ons lab op het gebied van artrose modellen zijn inderdaad aan de oude kant. Hiermee wilden we echter laten zien dat ons lab al een zeer lange tijd bekend is op het gebied van de experimentele artrose modellen. In aanvulling op deze oude papers zijn er meer recente papers aangehaald, om te laten zien dat we deze artrose modellen nog steeds regelmatig uitvoeren en goed in de vingers hebben om de haalbaarheid van dit project te versterken.

- *Van Dalen et al. Interleukin-1 is not involved in synovial inflammation and cartilage destruction in collagenase-induced osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage 2017; 25(3):385-396*
- *De Munter W et al. High LDL levels lead to increased synovial inflammation and accelerated ectopic bone formation during experimental osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage 2016; 24(5):844-55*
- *Van den Bosch et al. Induction of Canonical Wnt Signaling by the Alarmins S100A8/A9 in murine knee joints: implications for osteoarthritis. Arthritis and Rheumatology 2016; 68(1):152-163*
- *Schelbergen RF et al. Prophylactic treatment with S100A9 inhibitor paquinimod reduces pathology in experimental collagenase-induced osteoarthritis. Annals Rheumatic disease 2015; 74(12):2254-8*
- *Blaney Davidson et al. Inducible chondrocyte-specific overexpression of BMP2 in young mice results in severe aggravation of osteophyte formation in experimental OA without altering cartilage damage. Annals of Rheumatic Disease 2015; 74(6):1257-64*

Verder is er ook gekeken of andere laboratoria op het gebied van experimentele artrose bekend zijn met onze artrose-modellen. Ook hiervan zijn referenties toegevoegd:

- *Thysen S et al. Targets, models and challenges in osteoarthritis research (Review). Disease Models & mechanisms 2015 8:17-30*
- *Christiansen B et al. Non-invasive mouse models of post-traumatic osteoarthritis (Review). Osteoarthritis and Cartilage 2015 23:1627-1638*
- *Brandt et al. Animal models of osteoarthritis (Review). Biorheology 2002 221-235.*

-3.4.3: Gegeven de nadruk die in de inleiding op ontsteking wordt gelegd, is het voor de commissie niet duidelijk waarom beide modellen (die verschillen in de mate waarin ontsteking optreedt bij de artrose) geen voorspellende waarde voor elkaar hebben. Als er geen resultaten worden gevonden in het collagenasemodel (grote ontstekingscomponent), heeft het dan zin om de effecten in het andere model te testen? De onderzoekers worden verzocht dit go/no go moment op te nemen of duidelijker uit te leggen waarom beide modellen onafhankelijk van elkaar onderzocht zullen worden.

Antwoord: De commissie heeft gelijk dat er in de inleiding veel nadruk wordt gelegd op ontsteking. Het klopt ook dat er tot nu toe in de literatuur beschreven is dat IL37 de ontsteking remt in experimentele ontstekingsmodellen. Echter, ons lab heeft gevonden dat in kraakbeenstukjes IL37 niet alleen de ontsteking kan remmen maar ook de kraakbeenafbrekende enzymen (zoals MMPs en ADAMTS enzymen) en hierdoor een direct effect heeft op het kraakbeen zonder dat er ontsteking aanwezig is. Hierdoor kan het zijn dat in het collagenase-geïnduceerde artrose model waar veel ontsteking aanwezig IL37 beschermend kan werken door de ontsteking te remmen, maar het kan ook zijn dat IL37 beschermend werkt in het DMM-model (minimale ontsteking) door de kraakbeenafbrekende enzymen te remmen en daarmee de progressie van kraakbeenschade te remmen en niet zozeer de ontsteking. Doordat IL37 kan aangrijpen op twee verschillende aspecten van artrose (ontsteking en kraakbeenafbrekende enzymen) zullen het collagenase-model en DMM-model onafhankelijk van elkaar onderzocht worden. Als reactie op deze opmerking is er meer duidelijk gegeven in de tekst van deze projectaanvraag waarom het noodzakelijk is om beide artrose onafhankelijk van elkaar te onderzoeken.

Description of Animal Procedures:

**DAP1*

-B: De onderbouwing voor het gebruik van twee geslachten, waardoor er tweemaal zoveel muizen nodig zijn, ontbreekt. Is er een reden om te veronderstellen dat er een verschil in kinetiek zal zijn tussen mannen en vrouwen? Kan de kinetiek in één van de twee geslachten onderzocht worden en vervolgens bevestigd met een klein aantal dieren in het andere geslacht?

Antwoord: De commissie heeft gelijk dat er in DAP1 beschreven is dat beide geslachten gebruikt zullen worden om de IL37 kinetiek te bepalen. Wij hebben echter geen sterke veronderstelling dat het verschil in kinetiek tussen mannen en vrouwen verschillend is. Artrose komt het meest voor in vrouwen, daarom hebben we besloten om DAP1 uit te voeren in alleen vrouwelijke muizen, waardoor er minder muizen nodig zijn voor deze DAP.

-B: Is het mogelijk om een globale fasering aan te brengen in deze experimenten, bijvoorbeeld eerst de expressie van IL37 te controleren op een vroeg tijdstip voordat er uitgebreide histologie zal plaatsvinden?

Antwoord: Het is een goed idee van de commissie om globale fasering aan te brengen, hiervoor zullen we DAP1 opsplitsen in twee delen. Eerst zullen we via RNA samples en wash-outs bepalen of het IL37-adenovirus op gen en eiwit niveau tot expressie wordt gebracht. Mocht het adenovirus goed tot expressie komen op RNA en eiwitniveau, dan zullen we vervolgens via histologie gaan kijken of het adenovirus zelf geen schade aanbrengt aan het gewricht. Mochten we er achter komen dat het IL37-adenovirus niet tot expressie komt op gen of eiwitniveau, dan hebben we een no-go moment en hoeven we ook geen experiment in te zetten voor histologie.

-D2: Het tweede deel van de vraag is niet beantwoord.

Antwoord: Deze opmerking betreft de vraag "measures to minimise adverse effects". Deze vraag hadden we in de DAP als volgt beantwoord:

"De muizen zullen gehuisvest worden in groepen met verrijking van de omgeving om stress geïnduceerd-gedrag te verminderen. De operatie en injecties zullen onder anesthesie worden toegepast om ongerief te verminderen. Om verdere welzijnsaantasting zoveel mogelijk te beperken zullen alle biotechnische handelingen worden uitgevoerd door bekwaam

biotechnologisch personeel en zullen de muizen dagelijks worden gecontroleerd op welzijn. Verder zullen de humane eindpunten zoals beschreven in dit projectvoorstel worden toegepast." Deze vraag hebben we nu uitgebreid met de volgende reactie:

Deze DAP is bedoeld om de kinetiek en basale effecten van het IL37-adenovirus te bestuderen in de muis. We gebruiken hiervoor naïeve muizen, dus we passen geen artrose model toe. Verder zullen de muizen hiervoor eenmalig een adenovirus injectie toegediend krijgen en is het een kortlopend experiment. Omdat we niet verwachten dat het IL37-adenovirus ongerief zal aanbrengen aan de muis, passen we geen maatregelen toe om negatieve effecten te minimaliseren.

De volgende tekst is toegevoegd aan alle DAPs: "In dit experiment wordt gebruik gemaakt van adenovirussen. Het afvalmateriaal zal worden afgevoerd volgens de DM-II richtlijnen, hierdoor zullen er geen negatieve effecten op de omgeving zijn."

-K: Is het ongerief juist ingeschat? Op grond waarvan is het ongerief van deze kortdurende procedure onder anesthesie ingeschat als matig ongerief? Er worden geen nadelige effecten van IL37 expressie verwacht en de looptijd van het experiment voor veel dieren is een week of minder.

Antwoord: De commissie heeft gelijk dat de mate van ongerief te hoog is ingeschat, aangezien het een kortlopend experiment is en er geen nadelige effecten van IL37 worden verwacht. Daarom is de mate van ongerief veranderd in licht ongerief.

*DAP2

-A: Is er een reden om geen go/no go moment op te nemen tussen beide studies? (geldt ook voor DAP3)

Antwoord: Deze opmerking betreft het feit dat we in het beschreven DMM-model twee experimenten zullen uitvoeren:

1) injectie van het IL37-adenovirus vroeg aan het begin van het DMM-model;

2) injectie van het IL37-adenovirus laat in het DMM-model wanneer er al schade aanwezig is.

Deze twee experimenten zijn onafhankelijk van elkaar. In het eerste beschreven experiment, waarin we het IL37-adenovirus vroeg in het model zullen injecteren, bestuderen we of artrose patiënten waarbij kort geleden artrose is vastgesteld, IL37 een beschermend effect kan hebben. Hierbij gaat het vooral om het bestuderen of IL37 de initiatie van kraakbeenschade kan remmen. In het tweede beschreven experiment, bestuderen we of artrose patiënten die al langere tijd artrose hebben en dus waarschijnlijk ernstigere kraakbeenschade aanwezig is, IL37 nog als therapie toegepast kan worden. Hierbij wordt vooral onderzocht of IL37 de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade kan remmen. In deze twee fasen vinden verschillende processen plaats waardoor het ene model niet voorspellend is voor het andere model. Hierdoor kunnen we in deze DAP geen go/no go moment invoegen.

-B: Waarom loopt het experiment beter in mannen en wat wordt in dit geval bedoeld met "beter lopen"? Zijn er om die reden minder dieren nodig om een statistisch significant resultaat te behalen? De onderzoekers vermelden dat het artroseproces in mannen anders verloopt dan in vrouwen. Gelden de conclusies die uit deze experimenten met alleen mannelijke dieren komen dan ook alleen voor mannen?

Antwoord: De commissie heeft gelijk dat er onduidelijk verwoord is, wat er bedoeld wordt met 'het experiment loopt beter in mannen'. Allereerst is de OA pathologie tussen mannetjes en vrouwtjes muizen hetzelfde, hierdoor gelden de conclusies die getrokken worden uit de experimenten uitgevoerd in het mannelijk geslacht ook voor het vrouwelijk geslacht. Wel is het beschreven dat geslachtshormonen in muizen de progressie van het artroseproces kunnen beïnvloeden (1). Zo zouden vrouwelijke hormonen de ernst van artrose kunnen verlagen, terwijl mannelijke hormonen kunnen leiden tot ernstigere artrose. In het DMM-model zijn vrouwelijke muizen hierdoor minder gevoelig voor de inductie van artrose. Voor mannelijke muizen is dit geen probleem en zal er artrose ontwikkeling plaatsvinden wanneer het DMM-model zal worden toegepast. Omdat we uit ervaring en vanuit de literatuur weten dat het DMM-model zeker artrose zal induceren in mannelijke muizen zal er minder variatie optreden wanneer we het DMM-model uitvoeren in het mannelijke geslacht en weten we zeker dat we het effect van IL37 op artrose kunnen bestuderen, terwijl dit bij vrouwelijke muizen niet zeker is. Omdat het DMM-model binnen het mannelijke geslacht zeker tot artrose zal leiden en er minder variatie plaatsvindt ten opzichte van het vrouwelijke geslacht, zullen er minder dieren nodig zijn om een statistisch significant resultaat te behalen. Wanneer we muizen met het vrouwelijke geslacht zouden willen gebruiken, zouden we grote groepen muizen nodig hebben wat we ethisch niet verantwoord vinden. Aangezien de pathologie tussen beide geslachten hetzelfde is, hebben we er daarvoor voor gekozen om muizen met het mannelijke geslacht te gebruiken. Onderstaande referentie is ingevoegd in de DAP.

(1) Ma HL et al. Osteoarthritis severity is sex dependent in a surgical Mouse model. Osteoarthritis and Cartilage 2007. 15(6):695-700

-H: De genoemde medicatie is geen pijnbestrijding.

Antwoord: De commissie heeft gelijk dat de genoemde medicatie (dexdomitor + ketamine) geen pijnbestrijdingsmiddelen zijn. Als reactie op deze opmerking zijn daarom de namen van de narcose middelen uit de tekst verwijderd.

*DAP3

-A: Is er een reden om geen go/no go moment op te nemen tussen beide studies? (geldt ook voor DAP3).

Antwoord: Deze opmerking betreft het feit dat we in het beschreven collagenase-geïnduceerde artrose model twee experimenten zullen uitvoeren:

1) injectie van het IL37-adenovirus vroeg aan het begin van het collagenase-geïnduceerde artrose;

2) injectie van het IL37-adenovirus laat in het collagenase-geïnduceerde artrose wanneer er al schade aanwezig is.

Deze twee experimenten zijn onafhankelijk van elkaar. In het eerste beschreven experiment, waarin we het IL37-adenovirus vroeg in het model zullen injecteren, bestuderen we of artrose patiënten waarbij kort geleden artrose is vastgesteld, IL37 een beschermend effect kan hebben. Hierbij gaat het vooral om het bestuderen of IL37 de initiatie van kraakbeenschade kan remmen. In het tweede beschreven experiment, bestuderen we of artrose patiënten die al langere tijd artrose hebben en dus waarschijnlijk ernstigere kraakbeenschade aanwezig is, IL37 nog als therapie toegepast kan worden. Hierbij wordt vooral onderzocht of IL37 de progressie van de al aanwezige kraakbeenschade kan brengen. In deze twee fasen vinden verschillende processen

plaats waardoor het ene model niet voorspellend is voor het andere model. Hierdoor kunnen we in deze DAP geen go/no go moment invoegen.

-B: De aanvrager wil de experimenten met vrouwelijke dieren uitvoeren omdat de mannelijke dieren in dit model vaak vechten. Als redenen hiervoor worden de lange duur en randomisatie genoemd. De muizen worden op relatief oude leeftijd besteld bij de leverancier. Is al geprobeerd om dieren van jongere leeftijd te bestellen, waardoor zij gerandomiseerd kunnen worden zonder dat dit leidt tot vechten?

Antwoord: De commissie heeft gelijk dat de muizen op een relatief oude leeftijd besteld worden. Binnen ons lab zijn er al veel manieren geprobeerd om het probleem met vechtende mannetjes te voorkomen, waaronder de mannetjes muizen al op een jongere leeftijd te bestellen en vervolgens te randomiseren. Echter, hieruit is gebleken dat het probleem van de vechtende mannetjes blijft bestaan waardoor we niet het risico willen lopen dat we in de experimenten beschreven in de projectvoorstel te maken krijgen met hoge uitval door vechtende muizen en onze groepen te klein worden om nog een significant resultaat te kunnen behalen.

-B: De onderzoekers vermelden dat het artroseproces in mannen anders verloopt dan in vrouwen. Gelden de conclusies die uit deze experimenten met alleen vrouwelijke dieren komen dan ook alleen voor vrouwen?

Antwoord: Zoals eerder beschreven is in DAP 2 is de OA pathologie tussen het mannelijk en vrouwelijk geslacht hetzelfde. Hierdoor gelden de conclusies die we verkrijgen uit de experimenten met het vrouwelijke geslacht ook voor het mannelijke geslacht. Echter door het vechten van de mannelijke muizen kan het artroseproces versterkt worden en leiden tot een grote hoeveelheid dislocaties van het kniegewricht van de muis en dus uitval van een groot aantal muizen binnen het experiment, waardoor de kans bestaat dat de grootte van onze muizengroepen te klein wordt om een statistisch significant resultaat te behalen. Hierdoor zouden we grote groepen mannetjes muizen nodig hebben om een significant resultaat te kunnen bepalen, wat we ethisch niet verantwoord vinden. Omdat de OA pathologie tussen beide geslachten hetzelfde is, hebben we daarom gekozen om het collagenase-geïnduceerde artrose model in vrouwelijke muizen uit te voeren.

-I: Het ongerief van injecties is doorgaans niet matig maar licht.

Antwoord: De commissie heeft gelijk dat het ongerief van de injecties licht is. Echter, wordt het ongerief wat het collagenase-geïnduceerde artrose model met zich meebrengt gezien als matig ongerief. Daarom hebben we de mate van ongerief op matig laten staan.

Niet-technische samenvatting:

-De onderzoekers worden verzocht na te gaan of de beantwoording van bovenstaande vragen over het Project Proposal en de DAPs ook leidt tot aanpassingen in de NTS.

Antwoord: De Niet Technische Samenvatting is aangepast naar aanleiding van de bovenstaande opmerkingen.

-3.3: Men verwacht dat er minder dieren nodig zijn dan het maximaal te gebruiken aantal. Dit voorbehoud blijkt niet uit het project.

Antwoord: Naar aanleiding van de veranderingen toegepast in de DAPs, is het aantal dieren dat nodig is voor de beschreven experimentele artrose modellen aangepast.

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 en 4b uit de handreiking 'Wat is een project'. De verschillende subdoelen zijn noodzakelijk om de doelstelling te behalen. Het is niet mogelijk om de individuele doelen te toetsen, omdat er sprake is van onderlinge afhankelijkheid. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft, zowel binnen de doelstellingen en bijlagen dierproeven, als tussen de doelstellingen, beschreven op basis van welke criteria zij zal besluiten het project wel of niet te continueren. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van het project is bepalen of IL37 het artroseproces in muismodellen kan remmen of voorkomen. Het uiteindelijke doel is een bijdrage leveren aan de ontwikkeling van effectieve therapieën voor artrose. Het effect van IL37 wordt onderzocht in twee modellen waarin hetzij veel hetzij weinig gewrichtsontsteking optreedt. Op die manier wordt duidelijk bij welke patiënten een behandeling met IL37 een positief effect zou kunnen hebben. Er is binnen dit project daarom een directe relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het uiteindelijke doel. De DEC acht het waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project daaraan zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van het effect van IL37 op een artrotisch gewricht op dit moment zeer beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden voor artrose en dat daar behoefte aan is. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

Voor patiënten is dit onderzoek indirect van belang, omdat het op de lange termijn kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. Gerichte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een betere diagnostiek en behandeling met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt weer gezond wordt, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor invaliderende ziekten, zoals artrose, is van groot belang voor de samenleving.

6. Er is geen aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

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

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

Dodingsmethode niet volgens bijlage IV richtlijn (13c lid 3)

De aanvrager heeft als volgt onderbouwd dat dit noodzakelijk is: "Tijdens de ontwikkeling van artrose zal er geen pijnbestrijding plaats vinden, omdat dit effect kan hebben op het verloop van het artrose proces." De DEC is het eens met deze onderbouwing.

10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk bepaald door de operatie van het kniegewricht en door de voortschrijdende artrose. De DEC schat het ongerief voor de dieren in bijlage 1 in als licht (15% van de dieren). Voor de overige dieren zal het ongerief matig zijn.
12. De integriteit van dieren wordt in lichte mate aangetast door het induceren van artrose in één van beide knieën, en het instrumentele gebruik dat inherent is aan dierproeven.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring met deze diermodellen ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. Artrose is een complex degeneratief proces waarbij meerdere celtypen en het immuunsysteem zijn betrokken. Bovendien speelt mechanische belasting ook een rol. Effecten op artrose kunnen daarom niet goed zonder proefdiermodellen worden onderzocht. De onderdelen van het project die *in vitro* bestudeerd kunnen worden zijn al uitgevoerd. Voor het beantwoorden van de resterende onderzoeksvragen zijn dierproeven noodzakelijk.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Door de stapsgewijze aanpak waarin de resultaten uit eerdere proeven worden gebruikt voor het design van vervollexperimenten en het toepassen van go/ no go beslissingen wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Er wordt adequate pijnstilling toegepast waar dit nodig en mogelijk is. Van de meeste pijnstillers is bekend dat zij een effect hebben op ontstekingsprocessen in muizen, en van de overige pijnstillers is niet aangetoond dat zij geen effect hebben op ontstekingsprocessen in muizen. Ontsteking is een belangrijke parameter in dit onderzoek. Daarom is het niet mogelijk om de pijn die ontstaat door de zich ontwikkelende artrose te verlichten. De DEC is ervan overtuigd dat de beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

18. De aanvrager zal in het project in bijlage 1 en 3 alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren. In bijlage 2 zullen alleen mannelijke dieren gebruikt worden. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing:
- *bijlage 1: We kiezen ervoor om het expressiepatroon van het IL37-adenovirus te bestuderen in vrouwtjes muizen, omdat we geen sterke veronderstelling hebben dat er verschil aanwezig is tussen het expressiepatroon van het IL37-adenovirus in mannetjes en vrouwtjes muizen. Daarnaast komt artrose het meest voor in vrouwtjes muizen.
 - *bijlage 2: De OA pathologie tussen mannetjes en vrouwtjes muizen is hetzelfde, hierdoor gelden de conclusies die getrokken worden uit de experimenten uitgevoerd in het mannelijk geslacht ook voor het vrouwelijk geslacht. Het is beschreven dat geslachtshormonen in muizen de progressie van het artroseproces kunnen beïnvloeden. Zo zouden vrouwelijke hormonen de ernst van artrose kunnen verlagen, terwijl mannelijke hormonen kunnen leiden tot ernstigere artrose. In het DMM-model zijn vrouwelijke muizen hierdoor minder gevoelig voor de inductie van artrose. Voor mannelijke muizen is dit geen probleem en zal er artrose ontwikkeling plaatsvinden wanneer het DMM-model zal worden toegepast met minder variatie binnen de groepen. Wanneer we het DMM-model uitvoeren in vrouwelijke muizen zal er veel variatie plaats vinden en zouden we grote groepen muizen nodig hebben om een significant resultaat te kunnen behalen, wat we ethisch niet verantwoord vinden. Aangezien de pathologie tussen beide geslachten hetzelfde is, is er gekozen om muizen met het mannelijke geslacht te gebruiken.
 - *bijlage 3: De OA pathologie tussen het mannelijk en vrouwelijk geslacht zijn hetzelfde. Hierdoor gelden conclusies die we verkrijgen uit de experimenten met het vrouwelijke geslacht ook voor het mannelijke geslacht. Echter door het vechten van de mannelijke muizen kan het artroseproces versterkt worden en leiden tot een grote hoeveelheid dislocaties van het kniegewricht van de muis en dus uitval van een groot aantal muizen binnen het experiment. Hierdoor bestaat de kans dat de grootte van onze muizengroepen te klein wordt om een statistisch significant resultaat te behalen. Er zouden dan grote groepen mannetjes muizen nodig zijn om een significant resultaat te kunnen bepalen, wat we ethisch niet verantwoord vinden. Omdat de OA pathologie tussen beide geslachten hetzelfde is, hebben we daarom gekozen om het CiOA-model uit te voeren in vrouwelijke muizen.
- De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen met zo min mogelijk dieren te bereiken noodzakelijk is om de proeven in twee bijlagen met alleen vrouwelijke en in één bijlage met alleen mannelijke dieren uit te voeren.
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).
- NTS*
21. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?

2. Er vindt een lichte of matige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.

Voor patiënten is dit onderzoek op de lange termijn van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Artrose komt vaak voor in de bevolking, en de prevalentie zal waarschijnlijk toenemen door de vergrijzing. Deze aandoening belemmert patiënten sterk in hun dagelijkse bezigheden en vermindert hun kwaliteit van leven in ernstige mate. De enige effectieve behandeling op dit moment is een vervanging van het aangedane gewricht via een operatie, maar dit is niet zonder risico's voor de patiënt en is niet voor alle gewrichten mogelijk. Er is daarom behoefte aan behandelingen die het voortschrijdende artroseproces kunnen stoppen, en beschadigd kraakbeen kunnen herstellen. De resultaten van dit project zullen bijdragen aan de ontwikkeling van dergelijke therapieën voor artrose. Het is aannemelijk dat de doelstellingen op termijn behaald zullen worden. De commissie acht het ontwikkelen van een nieuwe therapieën voor artrose van substantieel belang.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: bepalen of IL37 het artroseproces in muismodellen kan remmen of voorkomen. Het uiteindelijke doel is een bijdrage leveren aan de ontwikkeling van effectieve therapieën voor artrose. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.

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

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
- Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
- De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
- De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.
3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Dhr. Instantie voor dierenwelzijn
Postbus 9101, [REDACTED]
6500 HB NIJMEGEN



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1030020171984
Bijlagen
2

Datum 1 juni 2017
Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer Instantie voor dierenwelzijn,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 juni 2017. Het gaat om uw project "Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1030020171984. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:

1 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020171984

Datum:
1 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171984

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: Dhr. Instantie voor dierenwelzijn
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 29
Postbus: 9101, [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
1 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171984

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Functie: Instantievoor Dierenwelzijn

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 juli 2017

Geplande einddatum: 30 juni 2022

Titel project: Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?

Titel niet-technische samenvatting: Kan de anti-ontstekingsstof Interleukine-37 (IL37) de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?

Naam DEC: RU DEC

Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]

E-mailadres DEC: [REDACTED]

Betaalgegevens

De leges bedragen: € 1.541,-

De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

Checklist bijlagen

Verplichte bijlagen: Projectvoorstel
 Beschrijving Dierproeven
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen: DEC-advies

Ondertekening

Naam: [REDACTED]

Functie: Instantie voor dierenwelzijn

Plaats: Nijmegen

Datum: 1 juni 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Instantie voor dierenwelzijn

Postbus 9101, [REDACTED]

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020171984

Bijlagen

2

Datum 1 juni 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 1 juni 2017

Vervaldatum: 1 juli 2017

Factuurnummer: 171984

Ordernummer: 040823-461220/ 2017-0012 / [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1030020171984	€ 1.541,00

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

Van: [REDACTED]
Verzonden: vrijdag 23 juni 2017 11:58
Aan: Postbus instantie voor dierenwelzijn
CC: [REDACTED]
Onderwerp: AVD1030020171984: Aanhouden beoordelen

Geachte Instantie voor Dierenwelzijn,

Op 1 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen? met aanvraagnummer AVD1030020171984. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze e-mail leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

-U geeft aan alleen vrouwelijke dieren te gebruiken in bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.3 en alleen mannelijke dieren in bijlage 3.4.4.2. U geeft voor bijlage 3.4.4.1 aan geen sterke veronderstelling te hebben dat er een verschil is tussen het expressiepatroon van het IL-37 adenovirus in mannelijke en vrouwelijke dieren. De reden om toch alleen vrouwelijke dieren te gebruiken is dat artrose meer voor komt in vrouwen.

Dit lijkt niet voldoende grond om deze proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren, met name omdat de proeven in bijlage 3.4.4.2 juist met mannelijke dieren worden uitgevoerd. Het is daarnaast niet geheel duidelijk waarom in bijlage 3.4.4.2 voor mannelijke dieren gekozen wordt, terwijl in bijlage 3.4.4.3 het onderzoek juist met vrouwelijke dieren wordt uitgevoerd. De argumentatie om in bijlage 3.4.4.2 mannelijke dieren te gebruiken lijken ook te gelden voor bijlage 3.4.4.3 en vice versa. U wordt verzocht uw keuzes voor het gebruik van of alleen mannelijke of alleen vrouwelijke dieren beter te onderbouwen.

-Het ongerief in de NTS komt niet overeen met het ongerief in de aanvraag. U wordt verzocht de NTS in overeenstemming te brengen met de aanvraag.

Opsturen informatie

De CCD zou u aanvraag graag in de eerstvolgende vergadering bespreken. Om die reden zouden wij uw reactie graag uiterlijk donderdag 29 juni ontvangen. Mocht dit niet haalbaar zijn, u heeft 14 dagen de tijd om de vragen te beantwoorden. U kunt uw reactie aanleveren via NetFTP en e-mail.

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Namens,

Centrale Commissie Dierproeven www.centralecommissiedierproeven.nl

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

Beste Commissie Centrale Dierproeven,

Op 1 juni 2017 heeft u een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen, getiteld "Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?" (aanvraagnummer AVD1030020171984). Naar aanleiding van deze aanvraag waren er nog enkele onduidelijkheden, die ik graag verder wil uitleggen.

Onduidelijkheid 1

U geeft aan alleen vrouwelijke dieren te gebruiken in bijlagen 3.4.4.2 en 3.4.4.3 en alleen mannelijke dieren in bijlage 2.4.4. U geeft voor bijlage 3.4.4.1 aan geen sterke veronderstelling te hebben dat er een verschil is tussen het expressiepatroon van het IL-37 adenovirus in mannelijke en vrouwelijke dieren. De reden om toch alleen vrouwelijke dieren te gebruiken is dat artrose meer voorkomt in vrouwen. Dit lijkt niet voldoende grond om deze proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren, met name omdat de proeven in bijlage 3.4.4.2 juist met mannelijke dieren worden uitgevoerd.

Reactie

In bijlage 3.4.4.1 van de projectaanvraag is inderdaad beschreven om het expressiepatroon van het IL-37 adenovirus alleen te onderzoeken in vrouwelijke dieren. Deze keuze voor het gebruik van vrouwelijke vrouwen is zowel gebaseerd op het feit dat artrose meer voorkomt in vrouwen als dat mannelijke dieren eerder de neiging hebben om te gaan vechten. Dit zou kunnen leiden tot hoge uitval van dieren binnen onze groepen, waardoor het moeilijk kan worden om betrouwbare conclusies uit deze experimenten te halen. Aangezien bijlage 3.4.4.1 een validatie is van de methode die we willen gebruiken in de experimentele artrosemodellen, willen we zeker weten dat we goede en duidelijke conclusies konden trekken uit de experimenten van bijlage 3.4.4.1 voordat we de experimentele artrose modellen uitvoeren. Omdat we geen reden hebben dat het expressiepatroon van het IL37-adenovirus verschillend zou zijn tussen mannelijke en vrouwelijke dieren, wilden we niet onnodig veel dieren gebruiken en hebben we gekozen voor vrouwelijke dieren. Echter, weten we niet geheel zeker of het expressiepatroon van het adenovirus hetzelfde zal zijn in beide geslachten. Zoals u al opmerkt worden in bijlage 3.4.4.2 gebruik gemaakt van mannelijke dieren en in bijlage 3.4.4.3 wordt gebruik gemaakt van vrouwelijke dieren. De validatie experimenten in bijlage 1 zijn van groot belang voor de vervolgentoetsen in bijlage 3.4.4.2 en 3.4.4.3. Ondanks het feit dat we twee keer zoveel dieren nodig hebben, hebben we toch besloten om, naast het uitvoeren van de experimenten ter validatie van het IL37-adenovirus expressiepatroon in vrouwelijke dieren, ook dezelfde experimenten zoals beschreven in bijlage 3.4.4.1 uit te voeren in mannelijke dieren. Op deze manier kunnen we met zekerheid het juiste IL37 expressiepatroon bepalen tijdens de experimentele artrosemodellen voor zowel bijlage 3.4.4.2 als 3.4.4.3 en eventueel uitsluiten dat er verschillen zijn tussen het expressiepatroon van het IL37-adenovirus in mannelijke en vrouwelijke dieren. Mochten er inderdaad verschillen aanwezig zijn in het expressiepatroon van het IL37-adenovirus tussen mannelijke en vrouwelijke dieren, kunnen we onze experimenten in bijlage 3.4.4.3 optimaliseren met onze resultaten verkregen uit de experimenten van bijlage 3.4.4.1 met de mannelijke dieren.

Onduidelijkheid 2

Het is daarnaast niet geheel duidelijk waarom in bijlage 3.4.4.2 voor mannelijke dieren gekozen wordt, terwijl in bijlage 3.4.4.3 het onderzoek juist met vrouwelijke dieren wordt uitgevoerd. De argumentatie om in bijlage 3.4.4.2 mannelijke dieren te gebruiken lijken ook te gelden voor bijlage 3.4.4.3 en vice versa. U wordt verzocht uw keuzes voor het gebruik van of alleen mannelijke of vrouwelijke dieren beter te onderbouwen.

Reactie

In de projectaanvraag is inderdaad beschreven om voor bijlage 3.4.4.2 alleen mannelijke dieren te gebruiken en in bijlage 3.4.4.3 alleen vrouwelijke dieren.

In bijlage 3.4.4.2 gaat het om het experimentele DMM-model (surgical model for destabilization of medial meniscus-model). Argumentatie om dit model uit te voeren in mannelijke muizen komt voort uit de literatuur. In de literatuur is in 2007 het volgende artikel verschenen van Glasson SS *et al.*: "Osteoarthritis severity is sex dependent in a surgical mouse model" (Osteoarthritis and Cartilage, 2007). In deze studie wordt laten zien dat mannelijke muizen significant 'more severe' artrose ontwikkelen dan vrouwelijke muizen op alle tijdstippen van het zogeheten DMM-model. Mannelijke muizen laten extensieve fibrillatie zien, tidemark erosie en verlies van proteoglycanen, terwijl de effecten van dit model in vrouwelijke muizen zich beperken tot oppervlakkige fibrillatie en lokaal proteoglycaan verlies. De vrouwelijke muizen van verschillende strains laten sterke bescherming zien tegen dit artrosemodel, waardoor artrose zich niet of met mate ontwikkelt. Hierdoor is het moeilijk om het effect van IL37, waarvan we verwachten dat het een beschermend effect heeft op artrose, te onderzoeken op het moment dat er bijna geen artrose plaatsvindt. De keuze voor het DMM-model in mannelijke muizen wordt verder ondersteund vanuit de literatuur. Recent gepubliceerde studies waarin het DMM-model is toegepast door verschillende onafhankelijke onderzoeksgroepen, zijn allemaal uitgevoerd in mannelijke muizen. Voorbeelden van deze publicaties zijn:

- 1) Rachel E. Miller, Shingo Ishihara *et al.* Chemogenetic inhibition of pain neurons in a mouse model of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatology*, 2017
- 2) Oscar Alvarez-Garcia, Tokio Matsuzaki *et al.* Regulated in development and DNA Damage Response 1 Deficiency impairs autophagy and mitochondrial biogenesis in articular cartilage and increases the severity of experimental osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatology*, 2017.
- 3) P. Das Neves Borges, T. Vincent *et al.* Automated assessment of bone changes in cross-sectional micro-CT studies of murine experimental osteoarthritis. *PLoS One*, 2017.
- 4) Averi Gibson, Carrie Mingalone *et al.* Wnt7a inhibits IL-1 β induced catabolic gene expression and prevents articular cartilage damage in experimental osteoarthritis. *Scientific Reports*, 2017.

- 5) F Veronesi, G Giavaresi *et al.* Chondroprotective activity of N-acetyl phenylalanine glucosamine derivative on knee joint structure and inflammation in a murine model of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2017.
- 6) Miotla Zarebska, Chanalaris A *et al.* CCL2 and CCR2 regulate pain-related behavior and early gene expression in post-traumatic murine osteoarthritis but contribute little to chondropathy. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2017.
- 7) A Latourte A, C Cherifi *et al.* Systemic inhibition of IL-6/Stat3 signalling protects against experimental osteoarthritis. *Annals of Rheumatic Diseases*, 2016.
- 8) W Choi and J Chun. Upregulation of lipocalin-2 (LCN2) in osteoarthritic cartilage is not necessary for cartilage destruction in mice. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2017.
- 9) Neng-Yu Lin, Alfiya Distler *et al.* Inhibition of Notch1 promotes hedgehog signaling in a HES1-dependent manner in chondrocytes and exacerbates experimental osteoarthritis. *Annals of Rheumatic Diseases*, 2016.
- 10) NH Lim, TL Vincent *et al.* In vivo optical imaging of early osteoarthritis using an antibody specific to damaged arthritis cartilage. *Arthritis Research and Therapy*, 2015.

Gebaseerd op de studie uit 2007 van Glasson *et al.* die aantoonde dat de DMM-artrose maar matig ontwikkelt in vrouwelijke muizen en de recente publicaties die zijn verschenen waarin het DMM-model alleen uitgevoerd is in mannelijke muizen, hebben we besloten om onze experimenten beschreven in bijlage 3.4.4.2 alleen uit te voeren in mannelijke muizen. Hierdoor voorkomen we dat we onnodig veel muizen hoeven te gebruiken, die wetenschappelijk gezien geen extra inzicht zouden geven in het effect van IL37 op de experimentele artrose geïnduceerd door het DMM-model, door het ontbreken van een therapeutisch window. Wel weten we dat mannelijke muizen eerder de neiging hebben om te vechten dan vrouwelijke muizen. Hiermee is rekening gehouden in de berekening van de grootte van de experimentele groepen. Verder worden er maatregelen getroffen om de kans op vechten te minimaliseren, zoals voorkomen dat de muizen herverdeeld worden en er wordt gebruik gemaakt van lavendelspray. We hopen hiermee zo optimaal mogelijk te voldoen aan vermindering en verfijning.

In bijlage 3.4.4.3 gaat het om het experimentele artrosemodel collageenase-induced osteoarthritis (CiOA-model). Dit model zouden we graag alleen toepassen in vrouwelijke muizen. Het collageenase-induced OA-model kan zowel in mannelijke als in vrouwelijke muizen worden toegepast. Echter, uit eigen ervaring van onze diermodellen en gebaseerd op de literatuur is bekend dat mannelijke muizen vaker vechten. In 2013 is een publicatie verschenen van Meakin Lee *et al.*, genaamd: "Male mice housed in groups engage in frequent fighting and show a lower response to additional bone loading than females or individually housed males that do not fight" (Bone, 2013). In deze publicatie hebben ze de observatie gedaan dat mannelijke muizen betrokken zijn bij gevechten 1.3 keer per uur, terwijl vrouwelijke muizen niet vechten. Het vechten van de mannelijke muizen heeft hun onderzoeksresultaten beïnvloedt. Wat wij ervaren hebben uit onze dierexperimenten, is dat het vechten van mannelijke muizen resulteert in veel dislocaties van het kniegewricht. Wanneer er dislocaties optreden, is het niet verantwoord om de muizen in het experiment te laten, waardoor we de muizen vanwege ethische redenen uit het experiment halen. Verder is het beleid dat wanneer de muizen vechten, de vechter apart moet worden gezet wat weer invloed heeft op de ontwikkeling van artrose. Wanneer we mannelijke muizen zouden gebruiken zouden we veel muizen vroegtijdig uit onze experimenten moeten halen vanwege de dislocaties, waardoor we vanaf het begin grote experimentele groepen van muizen nodig hebben om nog betrouwbare conclusies te kunnen trekken uit onze resultaten. Vanwege het hoge aantal mannelijke muizen dat we voor dit model nodig zouden hebben en het ongerief dat dit met zich meebrengt, hebben we gekozen voor optimale verfijning van het experiment en besloten om bijlage 3.4.4.3 alleen in vrouwelijke muizen uit te voeren.

Onduidelijkheid 3

Het ongerief in de NTS komt niet overeen met het ongerief in de aanvraag. U wordt verzocht de NTS in overeenstemming te brengen met de aanvraag.

Reactie

Het klopt dat het ongerief in de NTS niet overeenkomt met het ongerief in de aanvraag. De NTS is in overeenstemming gebracht met de aanvraag.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Dhr. Instantie voor dierenwelzijn
Postbus 9101, [REDACTED]
6500 HB NIJMEGEN



04 JUL 2017

Datum 3 juli 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

**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
AVD1030020171984
Bijlagen
1

Geachte heer Instantie voor dierenwelzijn,

Op 1 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?" met aanvraagnummer AVD1030020171984. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 29 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek is de keuze voor het gebruik van mannelijke dan wel vrouwelijke dieren in de verschillende bijlagen verhelderd, en is de ongeriefsclassificatie in de NTS en de aanvraag met elkaar in overeenstemming gebracht.

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 "Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?" starten. De vergunning wordt afgegeven van 3 juli 2017 tot en met 30 juni 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 1 juni 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:
3 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171984

Bezwaar

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

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

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

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

Meer informatie

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

Centrale Commissie Dierproeven
namens deze:



M. G. de Peuter
Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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

Datum:
3 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020171984



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen

Adres: Postbus 9101, [REDACTED]

Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 3 juli 2017 tot en met 30 juni 2022, voor het project "Kan IL37 de gewrichtsschade tijdens experimentele artrose verminderen?" met aanvraagnummer AVD1030020171984, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 1 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 29 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 29 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 1 juni 2017, ontvangen op 1 juni 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 29 juni 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Validatie van het IL37-adenovirus in muizen				
	Muizen (Mus musculus) /	312	100% Licht	
3.4.4.2. Effect van IL37 op gewrichtsschade in het DMM-model				
	Muizen (Mus musculus) /	882	100% Matig	
3.4.4.3. Effect van IL37 op gewrichtsschade in het CiOA-model				
	Muizen (Mus musculus) /	882	100% Matig	

Aanvraagnummer:

AVD1030020171984

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:

AVD1030020171984

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:

AVD1030020171984

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 aanneemelijk is dat het een matige of ernstige vorm van pijn, lijden, angst of blijven schade zal blijven ondervinden. Als een dier in leven wordt gehouden, krijgt het de verzorging en huisvesting die past bij zijn gezondheidstoestand.

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

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

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

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

Inventaris Wob-verzoek W17-12										
nr.	document NTS 20172004	wordt verstrekt				weigeringsgronden				11.1
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g		
1	Origineel aanvraagformulier				x		x	x		
2	NTS	x								
3	Projectvoorstel				x		x	x		
4	Bijlagen beschrijving dierproeven				x		x	x		
5	DEC-advies				x		x	x		
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x		
7	Verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
8	Antwoord op verzoek om aanvullende informatie				x		x	x		
9	Adviesnota CCD		x							x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x		



Aanvraag Projectvergunning Dierproeven

Administratieve gegevens

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

1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300 <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 colspan="2">Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td colspan="2">Instantie voor dierenwelzijn</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>4 1 0 5 5 6 2 9</td> <td></td> </tr> </table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn		KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9							
Naam instelling of organisatie	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen																
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	Instantie voor dierenwelzijn																
KvK-nummer	4 1 0 5 5 6 2 9																
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Geert Groteplein</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td colspan="2">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>6500HB</td> <td>Nijmegen</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td colspan="2">NL90ABNA0231209983</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td colspan="2">UMC St Radboud</td> </tr> </table>	Straat en huisnummer	Geert Groteplein	10	Postbus	[Redacted]		Postcode en plaats	6500HB	Nijmegen	IBAN	NL90ABNA0231209983		Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud	
Straat en huisnummer	Geert Groteplein	10															
Postbus	[Redacted]																
Postcode en plaats	6500HB	Nijmegen															
IBAN	NL90ABNA0231209983																
Tenaamstelling van het rekeningnummer	UMC St Radboud																
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	<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 colspan="2">PhD-student</td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td colspan="2">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td colspan="2">[Redacted]</td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td colspan="2">[Redacted]</td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie	PhD-student		Afdeling	[Redacted]		Telefoonnummer	[Redacted]		E-mailadres	[Redacted]	
(Titel) Naam en voorletters	[Redacted]	<input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie	PhD-student																
Afdeling	[Redacted]																
Telefoonnummer	[Redacted]																
E-mailadres	[Redacted]																
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td></td> <td><input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td colspan="2"></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td colspan="2"></td> </tr> </table>	(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.	Functie			Afdeling			Telefoonnummer			E-mailadres		
(Titel) Naam en voorletters		<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.															
Functie																	
Afdeling																	
Telefoonnummer																	
E-mailadres																	

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

2 Over uw aanvraag

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

3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- | | |
|------------|---------------------|
| Startdatum | 0 1 . 0 7 . 2 0 1 7 |
| Einddatum | 0 1 . 0 7 . 2 0 2 2 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Dynamic intravital imaging of breast cancer cell invasion and metastasis
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De invloed van cel-cel adhesie eiwitten op het uitzaaiingsproces van borstkanker
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|------------|
| Naam DEC | RU DEC |
| Postadres | [Redacted] |
| E-mailadres | [Redacted] |

4 Betaalgegevens

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

5 Checklist bijlagen

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

6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie
 Dierproeven
 Postbus 20401
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
 - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
 - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
 - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
 - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam	██████████
Functie	Instantie voor dierenwelzijn
Plaats	Nijmegen
Datum	0 1 - 0 6 - 2 0 1 7
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'.	10300
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
1.3	Provide the title of the project.	Dynamic intravital imaging to study the role of [REDACTED] in breast cancer cell invasion and metastasis

2 Categories

2.1	Please tick each of the following boxes that applies to your project.	<input checked="" type="checkbox"/> Basic Research
		<input type="checkbox"/> Translational or applied research
		<input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production
		<input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier
		<input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures

 Higher education or training

 Forensic enquiries

 Maintenance of colonies of genetically altered animals not used in other animal procedures

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Metastasis, in which cancer transitions from a local to a systemic disease, is fundamental to mortality of breast cancer and all other carcinomas. Cancer cells invade the tissue surrounding the primary tumor to metastasize during early phases of cancer disease. Furthermore cancer cells can evade and disseminate from metastases, and cause new metastases and disease progression. Thus, understanding the mechanisms of metastatic progression is relevant for early and late-stage cancer disease; consequently, research dissecting the steps and mechanisms of metastasis is critical for successful molecular targeting of metastasis in high-risk patients and at any stage of already metastatic disease.

The metastatic cascade is a complex multistep process involving different tissues at different times. The steps include dissemination of cancer cells from the primary tumor, invasion of local tissue to reach blood vessels, intravasation, survival in the circulation, extravasation and colonization of distant organs. Each of the tissues traversed consists of different components, like fibrous extracellular matrix (ECM) of different densities and compositions, blood vessels, nerve bundles and muscle fibers, cell types like fibroblasts and immune cells, and different chemical environments including growth factors and chemokines. Consequently, these steps all impose their own requirements on the migrating tumor cells for survival and metastasis. Therefore, major interest of the laboratory focuses on the mechanisms that enable (i) local tissue invasion, (ii) entering circulation of the blood system, and (iii) successful arrival of cells at distant sites to establish secondary tumors. Importantly, all these steps occur in the living organism and cannot be recapitulated by *in vitro* models alone in sufficient detail for the analysis of their underlying mechanisms and relevance for therapy. Therefore, further investigations critically depend upon research in higher vertebrates. Despite intensive research, many of these steps are still poorly characterized.

The original paradigm of cancer cell invasion stated that all cancers disseminate individually after losing XXXXXXXXXX and other epithelial features in a process called epithelial-mesenchymal transition (EMT). Contrary to this notion, recent accumulating evidence shows that collective migration is an important strategy by which cancer cells locally invade tissue, survive in the bloodstream and establish colonies at secondary sites

[1,2,3,4]. In collective migration, the same processes that occur in migration of individual cells, such as local matrix remodeling, traction force generation and sensing of guidance cues, occur at a multicellular level. In order to move as a group, cancer cell collectives require [redacted], which maintain cluster integrity while ensuring mobility of the group [9], particularly [redacted] mediated by [redacted] which is the main [redacted] molecule in mammary and all other epithelia. Thus uncertainty exists about the occurrence and mechanisms of both modes of migration, as well as their relative contributions to metastasis and the requirement of [redacted] in cancer cell invasion.

To form [redacted], including [redacted], directly interact with the cytosolic protein [redacted] (hereafter referred to as [redacted]), and this interaction is required to stabilize [redacted]. In addition to strengthening [redacted] fulfills multiple other functions, including controlling cell motility through the activity of the [redacted] and after translocation into the nucleus the regulation of several transcription factors, such as [redacted] and [redacted] which control the expression of inflammatory cytokines and cell survival. Whether [redacted] contributes to cancer metastasis is unclear.

Based on preliminary data from the previous project studying the role of [redacted] in local invasion and metastasis (RU-DEC 2011-039), an unexpected function of [redacted] in supporting collective invasion and, in one cell model, enhanced metastasis was found. After orthotopic implantation of non-metastatic [redacted], tumors grew more rapidly but did not gain the ability to metastasize. In [redacted] tumors, invasion was largely undiminished after [redacted] knockdown, but metastatic ability impaired. As we found out after the experiments were completed, the analysis of circulating tumor cells (CTCs) was unfortunately inconclusive, for technical reasons. The [redacted] to obtain peripheral blood resulted in contamination with epidermal cells, which stained cytokeratin positive and imposed as false-positive events confounding circulating breast cancer cell counts. Therefore, this dataset needs to be repeated by a more reliable puncture route [redacted] for longitudinal analysis; [redacted] at end-point).

These combined preliminary data strongly suggest a metastasis-enhancing role of cell-cell cooperation, mediated by [redacted], and conflicts with published work on [redacted] as a cancer suppressor gene.

Based on these results, we pursue the new hypothesis that [redacted] support the metastatic cascade. Using a dual strategy, we first aim to verify the preliminary results on the function of [redacted] by additional experiments and improved CTC analysis strategy. In addition to [redacted] we aim to validate the function of [redacted] in metastasis, by targeting [redacted] as a non-redundant [redacted] protein.

This in-depth analysis on the role of [redacted] in metastasis will provide definitive proof and mechanistic insight into how [redacted] support metastatic progression.

A poorly understood aspect of [redacted] is its [redacted]. The usage of [redacted] leads to the expression of multiple [redacted] that differ in [redacted]. The two most common [redacted], exhibit cell type-specific expression patterns. [redacted] is often expressed in [redacted] and [redacted] as well as in [redacted] and neuronal cells. [redacted] on the other hand, is mainly expressed in [redacted] cells. [redacted] are functionally distinct, as they each have unique binding partners (e.g. [redacted] [5] and [redacted] [6]), and differ in affinity for shared binding partners (e.g. [redacted] [7]). The induction of EMT causes a switch from [redacted] to [redacted] expression, and increased motility has been observed in cells lines expressing [redacted] *in vitro* [8]. Combined with the EMT paradigm, this has led

to the view that cancer cells, when gaining migratory properties, acquire a single cell phenotype and switch from [REDACTED] to [REDACTED]. These data implicate differentially expressed [REDACTED] in [REDACTED] regulation in cancer cells during invasion and metastasis *in vivo*. Deviating from the EMT paradigm, using the first [REDACTED]-specific antibody which we recently developed, we found that the expression of [REDACTED] but not [REDACTED] is increased at the invasive front of breast tumors in histological sections in patient samples and in migrating groups of breast cancer cells *in vitro*, whereas [REDACTED] expression is reduced or lost. Thus, specific upregulation of [REDACTED] and/or down-regulation of [REDACTED] may increase invasive potential, possibly by tuning [REDACTED] strength. This concept is supported by our recent finding that the [REDACTED] ratio in invading regions is increased in patients that suffered from distant metastases. This indicates that [REDACTED] expression is a clinically relevant factor in breast cancer metastasis. Furthermore, using targeted downregulation of [REDACTED] in breast cancer cells *in vivo*, we found that the cells showed reduced capacity to metastasize to the lung, indicating that the relevance of [REDACTED] in breast cancer is complex and that certain [REDACTED] types, i.e. those containing [REDACTED] and [REDACTED] may actually enhance metastasis.

Thus, our preliminary data suggest that [REDACTED] critically influences the metastatic ability of tumor cells *in vivo*. To validate these findings and identify mechanisms to inhibit this process, the following questions will be addressed in this study: 1) Do collective and single cell migration modes lead to different metastatic efficiency? 2) Do [REDACTED] promote or limit the efficacy of invasion into the mammary gland? Furthermore, preliminary data suggest that migrating tumor cells differentially express [REDACTED]. In this study, we aim to elucidate the effects of [REDACTED] expression on [REDACTED], cancer cell invasion and metastasis in the complex environments of the body.

References:

1. Bronsert, P *et al.*, Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three-dimensional study of the human cancer–host interface, *J Pathol* 234: 410–422 (2014)
2. Cheung, K *et al.*, Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters, *PNAS* vol 113 no 7 E854-E863 (2016)
3. Khalil, A *et al.*, Unpublished work
4. Friedl, P *et al.*, Tumour cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms, *Nature Reviews Vol 3* (2003)

[REDACTED]

9. Venhuizen and Zegers (2017), Making heads or tails of it: Cell-Cell Adhesion in Cellular and Supracellular Polarity in Collective Migration, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2017 Feb 28

3.2 Purpose

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

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

The main objective of this study is to elucidate the roles of [REDACTED]-based [REDACTED] and [REDACTED] in the different steps of breast cancer cell invasion and metastasis. We will accomplish this by using established cell models for metastatic breast cancer, which were genetically engineered to lack [REDACTED] or selectively express either [REDACTED] in a KO background.

We will study the passage of these cell lines through the different steps of the metastatic cascade in the following way:

- 1) local tissue invasion: an orthotopic mammary imaging window model set-up in our lab allows us to apply intravital multiphoton microscopy (MPM) over a time course of multiple days together with end-point [REDACTED] for imaging of local tissue invasion and tumor-cell intravasation into the vasculature of the same mouse;
 - 2) successful entry into the vasculature and circulation: circulating tumor cells (CTCs) in the peripheral blood will be isolated and quantified, as well as [REDACTED] status;
 - 3) the frequency of reaching the lungs and other organs, survive and/or establish metastatic outgrowth:
- Metastatic outcome analysis will be achieved by serial sectioning and tumor-cell specific staining of the lungs and other organs, combined with imaging post-processing, metastasis screens and *ex vivo* immunofluorescent techniques.

In recent years we have set up the aforementioned techniques to address each key step of the metastatic cascade. These combined technologies enable the extraction of maximum information from the same animal and obtain mechanistically deep information on how deregulation of [REDACTED] and [REDACTED] affect different steps of the metastatic cascade. The results of this study will increase understanding of the fundamentals of collective breast cancer invasion, which will potentially lead to novel targets for therapeutic intervention.

3.3 Relevance

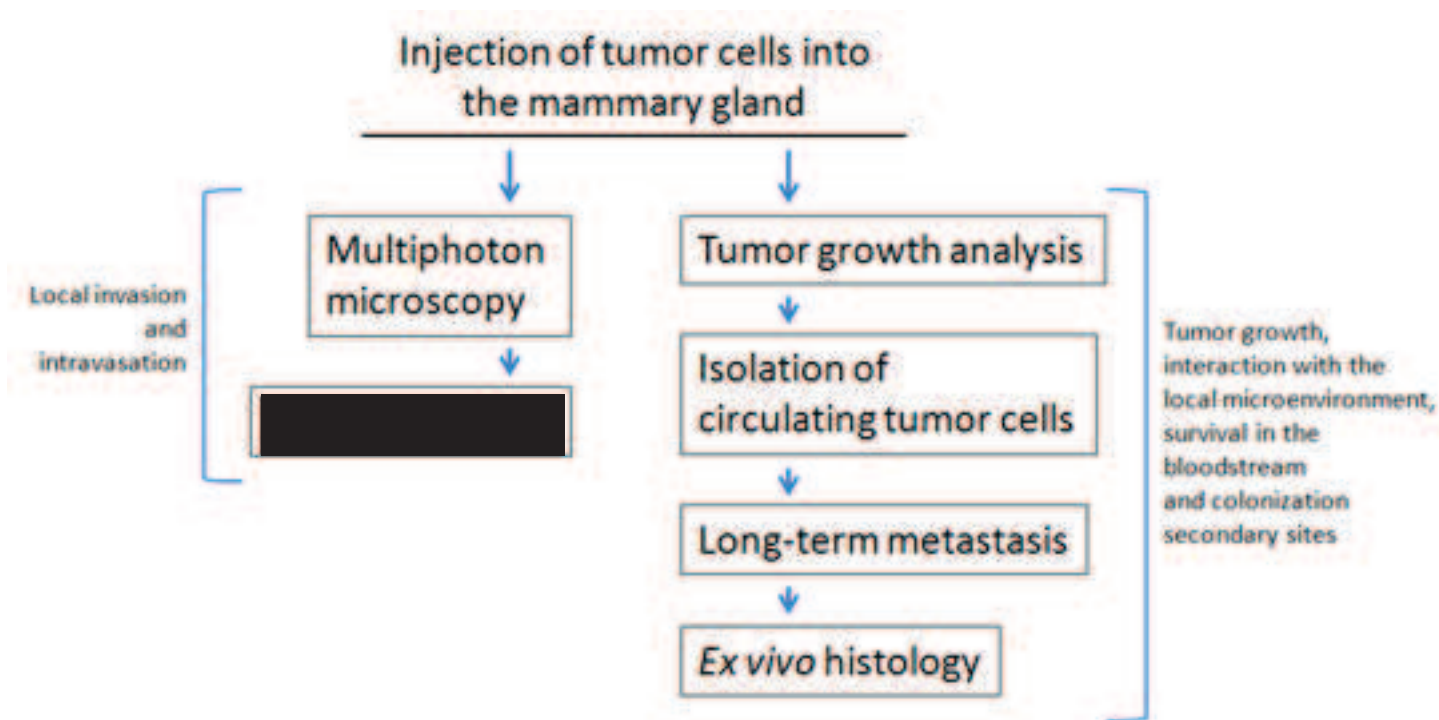
What is the scientific and/or social relevance of the objectives described above?

This study will provide fundamental knowledge about the mechanisms of invasion and metastasis and evaluate potential targets for therapeutic interference in critical steps of the metastatic cascade. Cancer mortality predominantly results from metastatic dissemination of tumor cells coupled to growth and resistance to therapy. Consequently, metastatic progression imposes significant burden to affected individuals from early to late-stage disease, either for medial follow up, different types of (neo)adjuvant treatment, and targeted therapy aiming to cure the disease or, at least, to limit further progression. To date, no therapeutic intervention is available to reduce metastatic propagation during either early or late-stage disease. Thus, addressing the molecular regulation of the metastatic cascade in breast cancer will advance the knowledge on how metastasis proceeds, and by which diagnostic and therapeutic strategies we can target early and/or late-stage metastasis. Because [REDACTED] signalling is strongly linked to growth and survival, a potential scenario of this project could demonstrate strategies to detect aggressive subsets, by differential [REDACTED] and [REDACTED] staining in tumor samples, and/or to silence active metastasis. If inhibition of [REDACTED] indeed causes impaired functions of cancer

cell collectives and compromised ability to invade tissue and metastatic efficacy, future anti-cancer therapeutic approaches might aim to inhibit the function of [REDACTED] and their downstream signals, both strategies currently not considered for (pre)clinical application.

3.4 Research Strategy

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



Tumor cells with fluorescent labels will be injected into the mammary gland of Balb/c mice or nude mice, to monitor subsequent invasion and metastasis. The cells will be genetically modified to express an shRNA against [REDACTED] have a [REDACTED] knock-out or express only one specific [REDACTED]. We will use two complementary strategies, in order to cover the metastatic cascade:

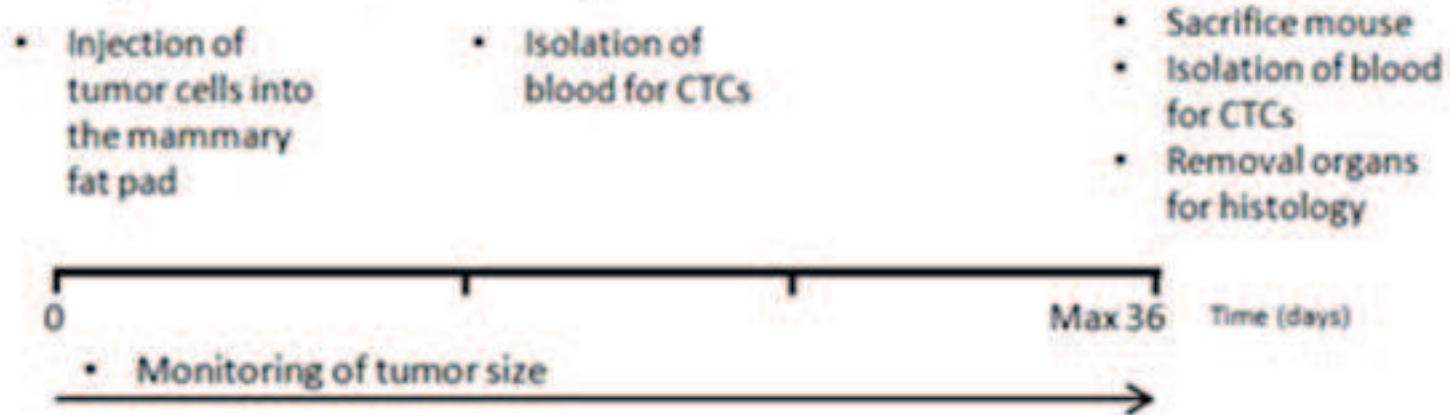
1) in a longitudinal experiment the presence of circulating tumor cells (CTCs) and the formation of metastases will be monitored for up to 36 days. The following parameters will be measured: CTCs; the absolute CTC amount/ml blood and change over time, their [REDACTED] state (individual

or clustered), the growth of primary and secondary tumors, including tumor growth rates, the number, size and location of metastases (including counts for single, dormant cells), the [REDACTED] state (staining of [REDACTED]), the frequency of proliferating cells (geminin staining), neo-vascularization (fluorescence detection of blood vessels) and the response of the tumor microenvironment (collagen deposition, immune cell infiltration). This will provide us with information on the growth of the primary tumor, interaction with its local microenvironment, survival of tumor cells in the bloodstream, and colonization of secondary sites.

2) The mammary imaging window will be used for intravital microscopy on orthotopic tumors. The mammary window/ multiphoton microscopy (MPM) approach will be used to study mode of migration, route of migration (tissue tracks), speed of migration, cluster dynamics and interaction with the local microenvironment. Using intravital MPM, we will visualize cancer cell invasion into different types of tissue (e.g. fibrous tissue, adipocytes, striated muscle, nerves) by fluorescence and label-free imaging. Additionally, perfused blood vessels will be labeled *in vivo* using fluorescent dextran. All this is imaged in parallel to the fluorescent tumor cells, providing detailed high resolution information on the migration of tumor cells in their pathophysiological environment. [REDACTED] will allow access to regions of the tumor otherwise microscopically inaccessible, and will allow real-time monitoring of intravasation. This will give us information on the dynamics of local invasion and interaction with the microenvironment, and intravasation.

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.

Longitudinal metastasis study



Invasion study



The longitudinal metastasis study will involve injection of fluorescent tumor cells into the mammary fat pad. The growth of the tumor will be monitored using whole body fluorescent imaging or caliper measurements. For CTC detection, blood will be drawn from the submandibular vein on day 0 just before tumor cell injection and on other timepoints separated by at least 7 days. At the end of the experiment, under terminal anesthesia [REDACTED], and commonly colonized organs including the mammary glands, lungs, liver, spleen and tibia will be removed for subsequent histology.

The invasion study (max. 21 days) will involve mammary window surgery, spheroid implantation and epifluorescence overview imaging on day 0. The tumor will be repeatedly imaged with (time-lapse) multiphoton microscopy to monitor the dynamics of tumor cell invasion into the breast tissue, with a minimum recovery period of 24h between microscopy sessions. [REDACTED] will be performed only under terminal anesthesia.

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

Metastasis is a sequence of events, which can only be understood by monitoring each key step, including (1) local tumor growth, (2) tumor cell mobility / invasion of the local stroma, (3) intravasation into blood vessels of the tumor core or the peri-tumor stroma, (4) survival in the circulation, (5) colonization of distant organs (i.e. lung and liver) and (6) metastatic outgrowth. We use two complementary experimental paths to cover the entire range of steps from the metastatic cascade mentioned above. These strategies will aid in defining the rate-limiting step(s) of the molecular pathway and identify possibilities for therapeutic intervention.

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	Longitudinal metastasis study of breast cancer cells after orthotopic implantation
2	Intravital imaging of breast cancer invasion

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300	
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen	
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	Serial number 1	Type of animal procedure Longitudinal metastasis study of breast cancer cells after orthotopic implantation

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.

Metastasis results from reciprocal interactions between tumor cells and different tissue microenvironments, and therefore we use a longitudinal metastasis assay to study multiple steps of the metastatic cascade and end-point colonization of distant tissues and metastatic outgrowth. To study tumor cell migration in its physiological context, we will orthotopically inject tumor cells in the mammary fat pad. We will use two syngenic cell lines, the [REDACTED] and [REDACTED] cell lines, which are derived from the same tumor and are both highly invasive but differ in their [REDACTED]. Additionally, we will use the low-invasive human mammary cancer cell line MCF7. The use of cell lines will allow us to genetically modify them to downregulate [REDACTED] or express single fluorescently tagged [REDACTED], in addition to fluorescent nuclear labels, allowing *in vivo* monitoring of invasion.

As the study of local invasion using a mammary imaging window does not allow monitoring of metastasis over long time frames, we will perform a longitudinal metastasis study to study local growth and invasion, survival in the bloodstream, colonization of distant tissue and ultimate metastatic outgrowth. Growth of the primary tumor and metastatic outgrowth of colonies will be studied by epifluorescent whole-tumor measurement. *Ex vivo* histology will provide additional information about tumor morphology survival and proliferation (e.g. Ki67 proliferation marker and caspase-3 for apoptosis), [REDACTED] expression, the stromal reaction (e.g. by scoring the number and location of fibroblasts and immune cells) and vascularization. As our preliminary study shows that loss of [REDACTED] and retention of [REDACTED] expression in invasive regions correlates with poor prognosis, we expect to see more survival, vascularization and invasion of tumors expressing [REDACTED]. Additionally, we expect to see diminished metastasis after [REDACTED] knock down. Survival in the bloodstream will be monitored by the isolation and quantitative analysis of circulating tumor cells (CTCs). Additionally, microscopic analysis will provide information on the aggregation status, viability and expression levels of [REDACTED] molecules. We expect that expression of [REDACTED] and [REDACTED] will have an effect on the number of CTCs, their aggregation status and viability.

Technique	Primary outcome parameter
Tumor measurement with caliper	<ul style="list-style-type: none"> • Tumor size • Growth rates
Monitoring of metastasis	<ul style="list-style-type: none"> • Number • Size • Location
Histology	<ul style="list-style-type: none"> • Tumor architecture of primary tumor and metastases • Routes of invasion • Extent of invasion • Length of invasion strands • [REDACTED] • Vascularization • Immune infiltration • Proliferation state
CTC isolation	<ul style="list-style-type: none"> • Amount of CTCs in blood at different time points • Aggregation state of CTCs • [REDACTED]

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

In the **longitudinal metastasis study** (max 36 days), mammary tumor cells ([REDACTED], number dependent on growth characteristics of the cell line) will be injected into the lower right mammary gland of 6- to 24-wk-old mice. Tumor growth and regression is a main parameter to evaluate tumor aggressiveness. Therefore, the tumor volume will be regularly monitored by caliper measurements. Circulating tumor cells (CTCs) are an early predictive marker for metastasis formation. Therefore, blood will be collected for **isolation of circulating tumor cells** to investigate the number, aggregation state, viability and [REDACTED] protein expression of the CTCs. Blood will be collected in [REDACTED] μ l samples ([REDACTED] [REDACTED] by puncture of the [REDACTED] with a minimum recovery period of 1 week in-between collections, or using [REDACTED] at the experimental end point under terminal anesthesia.

Under terminal anesthesia, the mouse will be sacrificed by cervical dislocation without the animal regaining consciousness and organs and tumor tissue will be excised for further immunohistochemical analysis (e.g. screening for micrometastases). To visualize hypoxic tumor regions, the anesthetized mouse will receive pimonidazole (60 mg/kg, i.v.) and Hoechst (20 mg/kg, i.v.) as perfusion control in the terminal imaging session. While Hoechst labels the nuclei of all cells, pimonidazole is selectively reduced in viable but hypoxic cells and can therefore be used as highly specific hypoxia marker by subsequent immunohistochemical staining. Under terminal anaesthesia we will further occasionally test new fluorescent imaging agents to visualize cells of the microenvironment, blood vessels or other tissue structures and their metabolic condition. For some experiments **perfusion fixation** will be applied to optimally preserve the nanotopography of tissue structures.

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

Estimated numbers:

For this project, we expect to use a maximum of 267 mice in 5 years. This estimation is based on the following considerations.

Cell and subvariants:

We will have 3 cell lines, the [redacted] and [redacted] mammary cancer cell lines, and the human [redacted] cell line. 6 subvariants for the [redacted] and [redacted] cell lines: wild- type control, [redacted] (two shRNAs), [redacted]. The [redacted] cell line does not express [redacted] and therefore no [redacted] will be performed.

Calculation of animal numbers:

Our primary outcome parameter of the longitudinal metastasis studies will be number of (micro)metastases. The means of the groups will be compared using independent two-tailed student's t-tests (Wilcoxon-Mann-Whitney), which will be corrected for multiple comparisons. In previous experiments, the effect size was 1.1 for [redacted] cells. We expect similar effects for [redacted] cells. Using Gpower 3 statistical software, the groups size was calculated to be 15 mice per condition with a power set at 0.05 and 0.8, respectively.

Longitudinal metastasis assay ((2 (cell lines) * 6 (subvariants) + 1 (cell line) * 4 (subvariants)) * 15 (group size)) = 240

A dropout rate of 10% is taken into account. This dropout rate may be caused by failed tumor growth, or mice presenting with too much clinical adversity. Correction for dropout rate is done with the following formula: $N = \text{animal} / (1 - \text{dropout rate})$

This places the total number of mice at 267

Considerations for minimization of the number of animals:

Histology and multiple CTC analyses over a longer period of time are compatible with each other and therefore are performed on the same animal.

B. The animals

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

Species. To be able to extrapolate the results of this research to invasion and metastasis in humans, it is necessary that the tumor microenvironment of the model animal is comparable to the mammalian system. While specific mechanistic questions may be answered in models using lower species such as zebrafish, we here aim to study the complex interactions between migrating tumor cells and the host microenvironment which result in metastasis. These processes are further metabolically critical and the cells require 37°C as tissue temperature. Therefore the mouse is used as the lowest possible organism with a tumor microenvironment comparable to humans.

Mouse strains.

In their native microenvironment, migrating tumor cells can encounter immune cells, which potentially shape the microenvironment and affect migration. Therefore, it is preferable to use immunocompetent mouse strains wherever possible. However, previous studies show that immune responses can be raised against cell lines expressing GFP over the course of several weeks¹. In our lab, small tumors of certain cell lines expressing two independent fluorophores for visualization were rejected after 1 week. Due to the preferability of the presence of immune cells, we will start experiments on [redacted] and [redacted] tumors with immunocompetent mice. Tumor growth will be carefully monitored, and if tumor remission is detected, we will switch to immunodeficient mouse strains.

The [redacted] and [redacted] tumor cell lines are derived from Balb/c mice and thus, Balb/c mice will be used in these studies to avoid rejection by the endogenous immune system. For the [redacted] shRNA studies, [redacted] and human [redacted] cells are used. To avoid rejection of the human [redacted], Balb/c nude mice will be used for these experiments. In case of tumor rejection, [redacted] and [redacted] cells will be implanted in nude mice, and SCID mice will be used for the [redacted].

Since female breast cancer cells are studied we will use female mice. To ensure that the pubertal development of the mammary gland is completed, we will only use mice older than 6 weeks. The maximum age of the mice will be 24 weeks.

Animal numbers. We expect to use a maximum of 267 mice in 5 years. The considerations that led to these numbers can be found in section A3.

References:

1. Bosiljic *et al.*, Myeloid Suppressor Cells Regulate the Lung Environment - Letter, *Cancer Res*; 71(14) (2011)

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mus musculus	Balb/c, Balb/c nude, SCID. From commercial supplier	267	6-24 weeks

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: In parallel to the intravital imaging models we have established organotypic assays to study tumor cell migration. This collagen-based migration assay mimics the 3D environment of a solid tumor and supports medium-throughput automated imaging to address the impact of multiple microenvironmental parameters on migration (e.g. collagen density). Additionally, immunofluorescence of tissue sections from human breast tumors were used for hypothesis validation. While we continuously use these models for functional studies, the complexity of reciprocal interactions between microenvironment and tumor cells cannot be mimicked entirely *in vitro* and thus these complementary *in vivo* studies are necessary.

Reduction: Preceding each experiment we routinely perform literature studies to avoid unnecessary repetition of experiments. We design the experiment in such a way that we generate novel data although, sometimes repetition is necessary to obtain up-to-date control data sets to exclude biological drift behavior of the source cells or to confirm hypotheses in our specific model setup and cell lines. In addition, we perform power calculations based on data from previous similar experiments or, if unavailable, based on *in vitro* data, to determine the minimum amount of animals needed. We also consider drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth or complications with the complex imaging setup. The methods used in this project are all well-established in the group and we can rely on multiple datasets with more than 5 years of experience to calculate or at least estimate group sizes of our experiments.

As a general policy, we design the experimental setup for maximal readout efficiency per mouse without compromising data quality. In the longitudinal experiment group, combining the drawing of blood for CTC detection and histology on organs of the same animal at the end of the experiment reduces the number of animals required. Furthermore, in the local invasion group, the use of the imaging window combined with MPM allows for intravital imaging at multiple time-points to obtain the time-course of tumor development, and using the same animal for [REDACTED] reduces the number of animals needed.

Refinement: In an extensive pilot-phase the discomfort level imposed on the animals carrying a chamber was assessed and resulted in the finding that significant discomfort to the animals is only imposed by the surgical procedure and concomitant injection anesthesia but 48 h after recovery from surgery, all mice showed normal nest building behavior as well as normal grooming and food uptake until the end of the experiment. The MIW was found to be compatible with group housing and the presence of an enriched environment. Moreover, the discomfort for the animals is further minimized by the application of anesthetics, analgesics and diligent care and attention to any sign of discomfort in the animal (described below and in section H.).

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

In order to prevent unnecessary discomfort or stress the general health of the animals will be checked daily by the researchers or the biotechnicians. We provide a detailed experimental setup scheme and welfare forms for each individual mouse in the experiment so that the biotechnicians can easily see in which stage of the experiment the animal is in. If necessary, anesthesia and analgesics will be applied to reduce discomfort. In case animals reach a humane end point the responsible researcher will be contacted and the mouse will be sacrificed on the same day. To keep track of food and water uptake as parameter of wellbeing, the mice will be weighed before the start of the experiment and at least twice per week during the experiment. Weighing frequency will be adjusted to the overall condition of the mice.

The methods applied in this project are well-established in our group and only well-trained researchers will perform the procedures. There are no probable adverse effects on the environment. Lentiviral transduction of cell lines is performed in an ML-II environment with 3rd generation vectors, to make sure that there is no chance of virus replication.

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.

Our intravital imaging platform in combination with the window model and our tumor models, optical reporters and application to study tumor cell migration as well as the biomedical questions addressed are rather unique worldwide. Nevertheless, naturally, we routinely perform literature research and constantly implement new knowledge in our planning of experiments. While aspects of an experiment will overlap with experiments performed in the literature, the aim and uniqueness of our strategy is to add in-depth information on mechanisms of metastasis which cannot be achieved by end-point histology or whole-body imaging of small animals commonly applied in other studies.

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.

Injection of tumor cells will be performed under short-term isoflurane anesthesia

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The most frequently occurring types of discomfort are:

- Stress (code 02, 100 %)- Tumor injections (code 02, 100 %)

- Recovery from short-term isoflurane anesthesia (code 02, 100 %)
- Tumor growth (code 03, 15 %)
- Repeated collection of blood samples <10% TBV (code 02, 100 %)
- Euthanasia (code 02, 100%)

Explain why these effects may emerge.

Stress can be caused by the handling of the animals and injections. In addition, the animals may experience stress from the recovery from anesthesia or tumor growth.

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

Recovery from anesthesia causes discomfort to the animal. However, this is required for cancer cell injection. Anesthesia duration will be minimized. The tumor growth can cause discomfort, especially in case of large tumors or ulcerating tumors. The mice will be checked daily by the researcher or biotechnician and if the tumor causes discomfort, the animal will be taken out of the experiment according to the humane endpoints. Mice will be kept for up to 36 days. Since metastases in lungs or brain can cause discomfort, the mice will be weighed regularly (2x /week). Experiments will be terminated before humane endpoints are reached.

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 accordance with the Code of practice - Animal experiments in cancer research by the Netherlands Inspectorate for Health Protection, Commodities and Veterinary Public Health, the animals will be sacrificed upon indications that one of the following conditions will be reached shortly:

1. Animal stopped eating and drinking.
2. Loss of body weight:
 - > 15% in 2 days
 - > 20% in total
3. Animal has difficulties breathing, or circulation problems occur.
4. Behavior and movement of the animal is aberrant.
5. Tumor and/or treatment cause clinical discomfort.
6. Tumor grows too large, $\geq 10\%$ of body weight or a maximum of 2 cm³.
7. Ulceration of the tumor.
8. Animal is expected to die on short term.
9. The endpoint of the experiment is reached.

Indicate the likely incidence.

The most likely humane end points to be reached are clinical discomfort due to the tumor growing too large, or large metastases being established. If these grow too large, it may impede the animal's mobility or cause difficulties in breathing. From previous experience, the likelihood of dropping out is 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).

We expect that 15% of the mice will experience moderate discomfort due to tumor growth, and 85% will experience mild discomfort due to handling and procedures during the experiment.

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.

At the end of the study we will collect tumor tissue, blood and organs for metastasis analysis, CTC detection or immunohistochemistry.

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

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

Yes

Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"><thead><tr><th>Serial number</th><th>Type of animal procedure</th></tr></thead><tbody><tr><td>2</td><td>Intravital imaging of breast cancer invasion</td></tr></tbody></table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Intravital imaging of breast cancer invasion
Serial number	Type of animal procedure					
2	Intravital imaging of breast cancer invasion					

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.

Metastasis results from reciprocal interactions between tumor cells and different tissue microenvironments, and therefore we will perform a local invasion study with intravital microscopy to study the dynamics of local tumor growth, invasion, tissue interaction and extravasation.

To study tumor cell migration in its physiological context, we will orthotopically inject tumor cells in the mammary fat pad. We will use two syngenic cell lines, the [REDACTED] and [REDACTED] cell lines, which are derived from the same tumor and are both highly invasive but differ in their [REDACTED]. Additionally, we will use the low-invasive human mammary cancer cell line MCF7. The use of cell lines will allow us to genetically modify them to downregulate [REDACTED] and [REDACTED] or express single fluorescently tagged [REDACTED], in addition to fluorescent nuclear labels, allowing *in vivo* monitoring of invasion.

Although tumor histology will provide us with valuable end-point information, metastasis is a dynamic process. Therefore, it is important to visualize these dynamic events. To this end, we will employ intravital multiphoton microscopy (MPM). MPM allows us to visualize surrounding tissue structures like muscle fibers and adipocytes using second and third harmonic generation. Based on *in vitro* findings we expect that downregulation of [REDACTED] will result in the switch from collective to individual-cell dissemination. However, in dense matrix collective invasion will persist, irrespective of [REDACTED] status, because tumor cells are pressed together ("jammed"). We expect that [REDACTED] expression has an effect on tumor cluster cohesiveness, shape, plasticity, mode and speed of migration, and will change the physical and cellular composition of the tumor microenvironment. These parameters will be monitored by MPM of tumor cells transduced with a nuclear label and fluorescent [REDACTED], and the detection of the stroma by fluorescent reporters and higher harmonic signal detection. We also expect [REDACTED] and [REDACTED] expression to affect intravasation, as the tumor cells have to [REDACTED] and squeeze through the endothelial layer of the blood vessel during this process which involves a phase of [REDACTED] with the vessel wall. Therefore, we use a [REDACTED] approach which uniquely allows us to monitor intravasation into the neovessels located in deeper regions of the tumor which are not accessible by conventional multiphoton microscopy.

Technique	Primary outcome parameter
MPM	<ul style="list-style-type: none"> • Speed of migration • Mode of migration • Extent of migration • Morphology of invading strands • Cluster dynamics (movement of tumor cells relative to one another) • Route of invasion/ 3D local microenvironment • Blood vessel perfusion
	<ul style="list-style-type: none"> • 3D architecture of microscopically inaccessible regions • Real-time imaging of intravasation

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

Mammary imaging windows (MIWs) will be transplanted onto 6- to 12-wk-old mice. The MIW consists of a titanium ring on top of which a glass coverslip is glued. The implantation of MIW includes surgical incision of the skin overlaying the lower right mammary gland; the ring is placed into the incision and fixed by placing the skin within a groove on the side of the ring and further sutured which ensures its fixation. 5-7 spheroids each containing [REDACTED] cells are implanted in the mammary gland at least 2 mm from each other (injecting more spheroids or closer together may lead to spheroid fusion and interfere with the experiment).

The tumor volume will be regularly monitored by caliper measurements or **epifluorescence overview imaging**. Epifluorescence imaging frequencies will be adjusted to the growth/regression rate of the tumor; usually, epifluorescence overviews are taken 1x to 3x / week.

Further, the tumor will be repeatedly imaged with (time-lapse) **multiphoton microscopy (MPM)** to monitor the dynamics of tumor cluster migration and interaction with the local microenvironment at subcellular resolution. Imaging sessions will not exceed 4 h (except under terminal anesthesia), and are performed max. 3 times per week with a minimum recovery period of 24 h. Outcome parameters include sub-regional tumor cell mobility as single cells or clusters, along with analysis of the 3D microenvironment such as adipose tissue, fibrous tissue and striated muscle. In a parallel project (RU-DEC 2014-031) we are currently developing a [REDACTED] which can be [REDACTED] into the tumor and allows multiphoton image acquisition in the tumor core at depths of up to 1 cm. Once this technique is established we will apply it in this project to monitor intravasation and migration in microscopically inaccessible regions in the terminal imaging session. [REDACTED] is only performed under terminal anesthesia.

Further, we are constantly generating and evaluating **molecular optical reporters** for single-cell readout of e.g. tumor cell viability and environmental conditions, such as pH or hypoxia, to enhance the information we acquire during imaging or to address specific microenvironmental targets which we identified in *in vitro* studies. These optical reporters are extensively studied in our *in vitro* models and once successful stable cell lines are generated they will be implemented in the intravital imaging routines. During multiphoton imaging, **fluorescent contrast agents** will be applied by i.d., i.p., i.v. or r.o. injection, including fluorescent high-molecular weight dextran for visualizing blood vessels, low-molecular-weight-dextran for assessing vascular leakage, optical protease probes, and/or fluorescent antibodies or lectins to label specific structures or cells. The appropriate optical imaging agent will be selected for the specific experiment and research question and maximal injection volumes and concentrations will be used according to the datasheet and the animal welfare guidelines. The area of optical reporter development is a fast-moving field and we will constantly review literature and integrate new, improved reporters to enhance the quality and biomedical depth of our experiments. Circulating tumor cells (CTCs) are an early predictive marker for metastasis formation. Therefore, in a subset of mice, blood will be collected for **isolation of circulating tumor cells** to investigate the number and aggregation state of the CTCs. Blood will be collected in [REDACTED] samples [REDACTED] TBV) by puncture of the [REDACTED] with a minimum recovery period of 1 week in-between collections, or using puncture of the heart at the experimental end point under terminal anesthesia.

Under **terminal anesthesia**, the mouse will be sacrificed by cervical dislocation without the animal regaining consciousness and organs and tumor tissue will be excised for further immunohistochemical analysis (e.g. screening for micrometastases). To visualize hypoxic tumor regions, the anesthetized mouse will receive pimonidazole (60 mg/kg, i.v.) and Hoechst (20 mg/kg, i.v.) as perfusion control in the terminal imaging session. While Hoechst labels the nuclei of all cells, pimonidazole is selectively reduced in viable but hypoxic cells and can therefore be used as highly specific hypoxia marker by subsequent immunohistochemical staining. In the terminal imaging session we will further occasionally test new fluorescent imaging agents to visualize cells of the microenvironment, blood vessels or other tissue structures and their metabolic condition. For some experiments **perfusion fixation** will be applied to optimally preserve the nanotopography of tissue structures.

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

Estimated numbers:

For this project, we expect to use a maximum of 275 mice in 5 years. This estimation is based on the following considerations

Cell and subvariants:

We will have 3 cell lines, the [REDACTED] and [REDACTED] mammary cancer cell lines, and the human [REDACTED] cell line. 6 subvariants for the [REDACTED] and [REDACTED] cell lines: wild- type control, [REDACTED] (two shRNAs), [REDACTED]. The [REDACTED] cell line does not express [REDACTED] and therefore no [REDACTED] will be performed.

Calculation of animal numbers:

For the dynamic invasion studies, the primary outcome parameter will be speed of movement and morphology criteria of invasive cancer strands. The groups will be compared using independent two-tailed student's t-tests and post-hoc correction for multiple comparisons. As the local microenvironment is highly heterogeneous, we expect an effect size of 0.6, yielding a total of 47 invasive strands per group. As we expect to be able to image 3-4 invasive regions per mice, the group size will be 13 mice.

Local invasion assay ((2 (cell lines) * 6 (subvariants) + 1 (cell line) * 4 (subvariants)) * 13 (group size)) = 208

A 20% dropout rate is taken into account. This dropout rate is caused by biological and technical factors, such as failure of tumor growth and invasion, but also inflammation of the mammary window or difficulties with imaging.

Correction for dropout rate is done with the following formula: $N = \text{animal} / (1 - \text{dropout rate})$

Accounting for the dropout rate and a group of 15 mice for MIW technique training makes a total of 275 mice.

Considerations for minimization of the number of animals:

The use of the MIW with MPM allows dynamic imaging at multiple time-points in the same mouse, which increases the richness of depth and reduces the number of animals required. As insertion of the [REDACTED] during [REDACTED] damages the tumor tissue (microtrauma) and might change its behavior thereafter, it will be carried out after the final MPM session.

B. The animals

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

Species.

To be able to extrapolate the results of this research to invasion and metastasis in humans, it is necessary that the tumor microenvironment of the model animal is comparable to the mammalian system. While specific mechanistic questions may be answered in models using lower species such as zebrafish, we here aim to study the complex interactions between migrating tumor cells and the host microenvironment which result in metastasis. These processes are further metabolically critical and the cells require 37°C as tissue temperature. Therefore the mouse is used as the lowest possible organism with a tumor microenvironment comparable to humans.

Mouse strains.

In their native microenvironment, migrating tumor cells can encounter immune cells, which potentially shape the microenvironment and affect migration. Therefore, it is preferable to use immunocompetent mouse strains wherever possible. However, previous studies show that immune responses can be raised against cell lines expressing GFP over the course of several weeks¹. In our lab, small tumors of certain cell lines expressing two independent fluorophores for visualization were rejected after 1 week. Due to the preferability of the presence of immune cells, we will start experiments on [REDACTED] and [REDACTED] tumors with immunocompetent mice. Tumor growth will be carefully monitored, and if tumor remission is detected, we will switch to immunodeficient mouse strains.

The [REDACTED] and [REDACTED] tumor cell lines are derived from Balb/c mice and thus, Balb/c mice will be used in these studies to avoid rejection by the endogenous immune system. For the [REDACTED] shRNA studies, [REDACTED] and human [REDACTED] cells are used. To avoid rejection of the human [REDACTED], Balb/c nude mice will be used for these experiments. In case of tumor rejection, [REDACTED] and [REDACTED] cells will be implanted in nude mice, and SCID mice will be used for the [REDACTED]

Since female breast cancer cells are studied we will use female mice. To ensure that the pubertal development of the mammary gland is completed, we will only use mice older than 6 weeks. The maximum age of the mice will be 24 weeks.

Animal numbers.

We expect to use a maximum of 275 mice in 5 years. The considerations that led to these numbers can be found in section A3.

References:

1. Bosiljic et al., Myeloid Suppressor Cells Regulate the Lung Environment - Letter, Cancer Res; 71(14) (2011)

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mus musculus	Balb/c, Balb/c nude, SCID From commercial supplier	275	6-24 weeks

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: In parallel to the intravital imaging models we have established organotypic assays to study tumor cell migration. This collagen-based migration assay mimics the 3D environment of a solid tumor and supports medium-throughput automated imaging to address the impact of multiple microenvironmental parameters on migration (e.g. collagen density). Additionally, immunofluorescence of tissue sections from human breast tumors were used for hypothesis validation. While we continuously use these models for functional studies, the complexity of reciprocal interactions between microenvironment and tumor cells cannot be mimicked entirely *in vitro* and thus these complementary *in vivo* studies are necessary.

Reduction: Preceding each experiment we routinely perform literature studies to avoid unnecessary repetition of experiments. We design the experiment in such a way that we generate novel data although, sometimes repetition is necessary to obtain up-to-date control data sets to exclude biological drift behavior of the source cells or to confirm hypotheses in our specific model setup and cell lines. In addition, we perform power calculations based on data from previous similar experiments or, if unavailable, based on *in vitro* data, to determine the minimum amount of animals needed. We also consider drop out of animals during the experiment due to experimental procedures, for example surgery, tumor growth or complications with the complex imaging setup. The methods used in this project are all well-established in the group and we can rely on multiple datasets with more than 5 years of experience to calculate or at least estimate group sizes of our experiments.

As a general policy, we design the experimental setup for maximal readout efficiency per mouse without compromising data quality. In the longitudinal experiment group, combining the drawing of blood for CTC detection and histology on organs of the same animal at the end of the experiment reduces the number of animals required. Furthermore, in the local invasion group, the use of the imaging window combined with MPM allows for intravital imaging at multiple time-points to obtain the time-course of tumor development, and using the same animal for [REDACTED] reduces the number of animals needed.

Refinement: The MIW was found to be compatible with group housing and the presence of an enriched environment. Moreover, the discomfort for the animals is further minimized by the application of anesthetics, analgesics and diligent care and attention to any sign of discomfort in the animal (described below and in section H.).

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

In order to prevent unnecessary discomfort or stress the general health of the animals will be checked daily by the researchers or the biotechnicians. We provide a detailed experimental setup scheme and welfare forms for each individual mouse in the experiment so that the biotechnicians can easily see in which stage of the experiment the animal is in. If necessary, anesthesia and analgesics will be applied to reduce discomfort. In case animals reach a humane end point the responsible researcher will be contacted and the mouse will be sacrificed on the same day.

To keep track of food and water uptake as parameter of wellbeing, the mice will be weighed before the start of the experiment and at least twice per week during the experiment. Weighing frequency will be adjusted to the overall condition of the mice and increased e.g. after surgery or during therapy and imaging periods.

The mice will receive Carprofen (5 mg/kg), as s.c. injection 30 min before the surgery and after 24h During anesthesia (surgery and imaging) the mice will be placed on a warm plate to prevent heat loss and will receive NaCl injections to avoid dehydration. Following the application of the imaging window, the mice will be housed in groups in a cage with ample nesting material. To minimize discomfort to the animal each imaging session will not exceed 4 h per mouse and a minimum recovery period of 24 h is maintained between imaging sessions. The mice will be imaged at a maximum 3x / week. Only in the terminal imaging session, in which the mouse will be sacrificed under anesthesia without regaining consciousness, imaging time might exceed 4 h. Thereby the possibility to acquire more imaging fields and longer timelapse series will strengthen the results. During anesthesia mice will receive subcutaneous normal saline injections to prevent dehydration and to reduce trauma.

The methods applied in this project are well-established in our group and only well-trained researchers will perform the procedures.

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.

Our intravital imaging platform in combination with the window model and our tumor models, optical reporters and application to study tumor cell migration as well as the biomedical questions addressed are rather unique worldwide. Nevertheless, naturally, we routinely perform literature research and constantly implement new knowledge in our planning of experiments. While aspects of an experiment will overlap with experiments performed in the literature, the aim and uniqueness of our strategy is to add in-depth information on mechanisms of metastasis which cannot be achieved by end-point histology or whole-body imaging of small animals commonly applied in other studies.

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.

The mice will receive Carprofen, as s.c. injection 30 min before the surgery and 24h thereafter. During anesthesia (surgery and imaging) the mice will be placed on a warm plate to prevent heat loss and will receive NaCl injections to avoid dehydration.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

- Stress (code 02, 100 %)- Repeated recovery from anesthesia (following surgery and imaging) (code 03, 100 %)
- Injections (code 02, 100 %)
- Recovery from surgery for mammary window application (code 03, 100 %)
- Repeated collection of blood samples <10% TBV (code 02, 100 %)
- Tumor growth (code 03, 15 %)
- Euthanasia (code 02, 100%)

Explain why these effects may emerge.

Stress can be caused by the handling of the animals and injections. In addition, the animals will experience stress from the recovery from anesthesia after surgery and the imaging procedure. Experience of pain will be related to injections of imaging agents and the surgical procedure for application of the MIW.

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

Recovery from anesthesia causes discomfort to the animal. However, this is required for imaging and surgery. Anesthesia duration will be minimized and whenever possible multiple biotechnical procedures will be combined (e.g. injection optical contrast agents, overview epifluorescence and multiphoton imaging). In order to minimize discomfort, the maximum number of times an animal recovers from long-term anesthesia is 3x / week, and after the last imaging session the animal will be euthanized without recovering from anesthesia. During anesthesia the animal will be placed on a warm plate to prevent heat loss and will receive regular NaCl injections to compensate for loss of fluids.

The tumor growth can cause discomfort, especially in case of large tumors or ulcerating tumors. In most cases of intravital imaging of invasion, we only need small tumors (1-4 mm in diameter). Therefore, the average tumor burden and related discomfort is low in most experiments. In this case, the mice will be checked daily by the researcher or biotechnician and if the tumor causes discomfort, the animal will be taken out of the experiment according to the humane endpoints. Mice will be kept for up to 21 days. Since metastases in lungs or brain can cause discomfort, the mice will be weighted regularly (2x /week). Experiments will be terminated before humane endpoints are reached.

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. Animal stopped eating and drinking.
2. Loss of body weight: > 15% in 2 days or >20% from starting weight
3. Animal has difficulties breathing, or circulation problems occur.
4. Behavior and movement of the animal is aberrant.
5. Tumor and/or treatment cause clinical discomfort.
6. Tumor grows too large, $\geq 10\%$ of body weight or a maximum of 2 cm³.
7. Ulceration of the tumor.
8. Animal is expected to die on short term.
9. The endpoint of the experiment is reached.

Experiment- / model-specific humane endpoints:

1. Inflammation or bleedings within the imaging window at levels which usually do not appear to cause discomfort of the mouse but preclude imaging.
-

Indicate the likely incidence.

The most likely premature end point to be met in these studies is inflammation in the imaging window (low discomfort for the animal but precludes imaging and perturbs meaningful biology). Inflammation usually becomes apparent shortly after surgery of the imaging window and causes an early drop-out rate (10 %) which however imposes only low discomfort to the animal due to the immediate termination of the experiment.

K. Classification of severity of procedures

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

We expect that mice in experiments will experience moderate discomfort due to repeated recovery from anesthesia necessary for MIW application and imaging and associated injections.

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.

At the end of the study we will collect tumor tissue, blood and organs for metastasis analysis, CTC detection or immunohistochemistry.

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

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

Yes

DEC-advies

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: 2017-0005
2. Titel van het project: Dynamic intravital imaging to study the role of [REDACTED] in breast cancer cell invasion and metastasis
3. Titel van de NTS: De invloed van cel-cel adhesie eiwitten op het uitzaaiingsproces van borstkanker
4. Type aanvraag:
 - nieuwe aanvraag projectvergunning
 - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: RUDEC
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED], bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: 22-02-2017
 - aanvraag compleet
 - in vergadering besproken: 07-03-2017
 - anderszins behandeld
 - termijnonderbreking(en) van 13-03-2017 tot 10-05-2017
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
 - aanpassing aanvraag: 10-05-2017
 - advies aan CCD: 01-06-2017
7. De inhoud van dit project is afgestemd met de IvD en deze heeft geen bezwaren tegen de uitvoering van het project binnen deze instelling.
8. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
9. Correspondentie met de aanvrager:
 - Datum vragen: 13-03-2017
 - Datum antwoorden: 10-05-2017
 - Gestelde vragen en antwoorden:

Project Proposal:

-1.3:De titel is erg algemeen gesteld en past beter bij een onderzoeksprogramma. Het doel van dit onderzoek is niet de imaging, maar het achterhalen van de rol van [REDACTED] en [REDACTED] in het metastaseringsproces. De commissie raadt de aanvragers aan een andere titel te kiezen.

Antwoord: The title was changed to 'Dynamic intravital imaging to study the role of [REDACTED] in breast cancer cell invasion and metastasis'

-3.1: Het is niet duidelijk hoe de inleiding aansluit op de gekozen doelstelling. Een afsluitende alinea waaruit blijkt welke hypothesen de aanvragers willen onderzoeken ontbreekt.

Antwoord: An extra paragraph has been added to conclude the introduction. In addition, see the reply below for preliminary data leading up to the hypotheses.

-3.1: Aan het slot van de derde alinea worden twee onderzoeksvragen geformuleerd. Hoe zullen de onderzoekers vraag 1 adresseren? Dit komt niet heel duidelijk naar voren in de aanvraag.

Antwoord: Based on preliminary data from the previous project studying the role of [REDACTED] in local invasion and metastasis (RU-DEC 2011-039), an unexpected function of [REDACTED] in supporting collective invasion and, in one cell model, enhanced metastasis was found. After orthotopic implantation of non-metastatic [REDACTED] cells, tumors grew more rapidly but did not gain the ability to metastasize. In [REDACTED] tumors, invasion was largely undiminished after [REDACTED] knockdown, but metastatic ability impaired. As we found out after the experiments were completed, the analysis of circulating tumor cells (CTCs) was unfortunately inconclusive, for technical reasons. The [REDACTED] to obtain peripheral blood resulted in contamination with epidermal cells, which stained cytokeratin positive and imposed as false-positive events confounding circulating breast cancer cell counts. Therefore, this dataset needs to be repeated with a more reliable puncture route ([REDACTED]).

These combined preliminary data strongly suggest a metastasis-enhancing role of cell-cell cooperation, mediated by [REDACTED], and conflicts with published work on [REDACTED] as a cancer suppressor gene.

Based on these results, we pursue the new hypothesis that [REDACTED] support the metastatic cascade. Using a dual strategy, we first aim to verify the preliminary results on the function of [REDACTED] by additional experiments and improved CTC analysis strategy. In addition to [REDACTED], we aim to validate the function of [REDACTED] in metastasis, by targeting [REDACTED] as a non-redundant [REDACTED] protein.

This in-depth analysis on the role of [REDACTED] in metastasis will provide definitive proof and mechanistic insight into how [REDACTED] support metastatic progression.

-3.1: Is er niet al veel voorwerk gedaan (onder andere door deze groep) naar het effect van [REDACTED]? De commissie mist de beschrijving daarvan.

Antwoord: This has been described in the reply above, and has also been added to the documents.

-3.2: Er worden drie technieken genoemd waarmee het effect van [REDACTED] op metastasering onderzocht zal worden. Het toepassen van een techniek is een middel om een doel te bereiken.

Kunnen de onderzoekers dit herformuleren als 'objectives'? Op die manier wordt ook duidelijker welke 'objectives' de aanvragers bedoelen in de eerste zin van de volgende paragraaf.

Antwoord: The section has been rewritten in order to clarify what the main objective is, and how the used techniques fit into this objective.

-3.4.2: De tumorgroei in de dieren in de invasie studie wordt meerdere keren per week gedurende meerdere weken gevolgd, waarvoor het dier telkens langdurig onder anesthesie gaat. De commissie kan zich voorstellen dat de stresshormonen die hierdoor vrijkomen en de

anesthesiemiddelen zelf een effect op de tumorgroei zullen hebben. Zijn de onderzoekers van plan om stresshormonen te meten? Is een extra controlegroep, die niet steeds onder anesthesie gaat, niet noodzakelijk om te controleren voor het effect van de herhaalde langdurige anesthesie?

Antwoord: We have addressed this point in a pilot study at the CDL in Nijmegen in 2010. We compared tumor growth in mice with and without repeated imaging (3x per week) and found no difference between the two groups. Furthermore, the mice in all the conditions will be subjected to precisely the same regime of anaesthetics and will experience the same levels of stress.

-3.4.2: Er worden twee studies gedaan: Een metastase studie van maximaal 36 dagen en een invasie studie van maximaal 21 dagen. Naar de mening van de commissie ligt het meer voor de hand om elke studie in een aparte DAP te beschrijven. Dit zou de navolgbaarheid van de bijlage(n) met dierproeven ten goede komen. (zie ook de algemene opmerking over de bijlage waarin de dierproeven zijn beschreven).

Antwoord: The two experimental strategies have now been described separately in section 3.4.4 under the following titles: 1) Longitudinal metastasis study of breast cancer cells after orthotopic implantation and 2) Intravital imaging of breast cancer invasion.

-3.4.2: Bloedafname via de [REDACTED] is bij knaagdieren niet gebruikelijk. Waarom willen de onderzoekers dit bloedvat gebruiken?

Antwoord: This was a mistake. It has been changed to only the [REDACTED].

Description of Animal Procedures:

-Algemene opmerking: de commissie adviseert u twee bijlagen te maken, omdat het twee verschillende diermodellen / studies betreft.

Antwoord: The comment has been implemented.

-A2: Toediening van contrastmiddel kan op meerdere manieren plaatsvinden. Waarom willen de onderzoekers het mogelijk retro-orbitaal toedienen als zij het ook i.v. kunnen toedienen?

Antwoord: In order to administer contrast agents intravenously, the mice need to be placed in a warm chamber to dilate the blood vessels in the tail vein. Some contrast agents need to be administered during imaging, which precludes extra warming of the mice, and makes intravenous injections difficult. Retro-orbital injection is possible during imaging, and therefore some contrast agents need to be administered retro-orbitally.

-A: Is 20% failure rate niet wat hoog, en waar wordt deze door veroorzaakt? Is deze voor beide studies even groot? De gehanteerde berekening om te compenseren voor 20% uitval is niet adequaat.

Antwoord: The 20 % failure rate is based on extensive previous experience with the imaging window and intravital imaging experiments. It accounts for dropout rates commonly associated with tumor studies, such as e.g. bad tumor growth/failed tumor injection, but on top accounts for experiment-specific risks such as little or no invasion of the tumor, inflammation of the imaging window, failure due to the complex imaging setup (image shifts during time lapse recordings, failure of the lasers/optical setup). In the past years, due to continuous optimization of all aspects of these kinds of experiments, we already reduced the dropout rate from 30 % to 20 %. The dropout rate of the longitudinal metastasis study is 10

%. The difference in dropout rates has been made clearer by the separation of the animal procedures into two separate descriptions.

-B: Bij de berekening van de aantallen muizen worden alle tumormodellen en modificaties daarin meegeteld, uit de tekst blijkt dat dit niet voor alle experimenten geldt.

Antwoord: Indeed the [REDACTED] are [REDACTED], and thus no [REDACTED] knock down will be performed in this cell line. The inclusion of this group in the calculations was an error, and has been corrected.

-B: De herkomst van de dieren is niet juist ingevuld.

Antwoord: The animals will be obtained from a commercial supplier or from own breedings in the CDL.

-D2: Onderdeel 2 van de vraag is niet beantwoord.

Antwoord: A section has been added about the possible impact on the environment.

-H: Is deze aanpak haalbaar bij groepshuisvesting? Hoe wordt dan geborgd dat elke muis afdoende pijnbestrijding krijgt?

Antwoord: Indeed, it is difficult to guarantee that every mouse eats sufficient Medigel in group housing. Therefore, we 'll administer an extra dose of carprofen 24h after surgery, instead of supplying Medigel.

-I: De herhaalde bloedafnames ontbreken. Injecties en operaties graag apart vermelden als bron van ongerief: een injectie zal niet leiden tot matig ongerief.

Antwoord: They have been listed as separated causes of discomfort.

-J: Is meer dan 20% gewichtsafname gedurende de studie geen humaan eindpunt in dit onderzoek?

Antwoord: It has been added as an independent humane end point..

-K: De dieren ondergaan langdurige anesthesie, driemaal per week gedurende 3-5 weken. Is dit matig of ernstig ongerief voor de dieren en waaruit blijkt dat?

Antwoord: Indeed, in the local invasion study the mice will undergo imaging sessions max. 3 times per week for max. 3 weeks. The cumulative discomfort for the animals is moderate. In 2010, before starting these kinds of experiments, we performed a pilot study to address the impact on the animals wellbeing and the imposed discomfort level. We monitored and quantified weight gain rates, nest building behavior and performed objective phenotypic studies to quantify curiosity behavior, day/night rhythm and mobility by comparing mice without a chamber and mice in an experiment. We found the initial surgery for window application to be the most stress inducing factor which was accompanied by a significant weight loss right after surgery. 24 h following surgery however, the mice started to regain weight at rates comparable to the control group and we found no significant impact on behavior, nest building and mobility throughout the experiment.

The mentioned frequency of imaging represents the maximum of imaging/anesthesia the mice may be subjected to. This frequency will be limited to the required minimum as soon as we obtain the first pilot data and are able to judge which frequency will be necessary. Commonly, in other comparable, however not identical experiments, we image the mice either 3x per week for only 1 week or once or twice per week for longer periods.

Niet-technische samenvatting:

-3.1: Deze inleiding is geen goede weerspiegeling van het project. ██████ en ██████ staan centraal in het project, maar worden hier niet genoemd. De onderzoekers worden verzocht dit in overeenstemming te brengen.

Antwoord: The introduction was rewritten to include ██████ and ██████. Additionally, the title was reworked to reflect the focus on ██████.

- 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 betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er is geen betrokkenheid van DEC-leden bij deze projectaanvraag, waardoor onafhankelijkheid en onpartijdigheid zijn gewaarborgd.

C. Beoordeling (inhoud)

1. Deze aanvraag heeft een concrete doelstelling en kan getypeerd worden als een eenvoudig project. De opzet komt het best overeen met voorbeeld 1 uit de handreiking 'Wat is een project'. Beide studies (longitudinale metastase studie en invasie studie) zijn noodzakelijk om de doelstelling te behalen. De samenhang tussen beide studies is evident. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De DEC is er van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien bovenstaande is de DEC van mening dat de aanvraag toetsbaar is en voldoende samenhang heeft.
2. Voor zover de DEC weet is er geen "tegenstrijdige" wetgeving die het uitvoeren van de experimenten in de weg zou kunnen staan.
3. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.

Belangen en waarden

4. Het directe doel van dit basaal wetenschappelijke project is het ophelderen van de rollen van ██████ (via ██████) en van ██████ in de verschillende stappen van invasie en metastasering van borstkankercellen in diersystemen. Het uiteindelijke doel is om de vorming van uitzaaiingen bij (borst)kankerpatiënten te voorkomen of af te remmen. Verschillende stappen van het uitzaaiingsproces worden onderzocht met tumorcellen waarin de expressie van ██████ of verschillende ██████ is geblokkeerd. Er zijn geen dierexperimenten gepland waarin een therapie op basis van de verkregen inzichten wordt getest. Er is binnen dit project dan ook geen directe relatie tussen het doel van deze projectaanvraag en het

uiteindelijke doel. De DEC acht het niet waarschijnlijk dat het uiteindelijke doel behaald zal worden binnen de duur van dit project. De aanvrager heeft duidelijk gemaakt wat de status van het onderzoeksveld is en wat de bijdrage van dit project daaraan zal zijn. Uit de aanvraag blijkt dat de kennis van de verschillende onderdelen van het metastaseproces op dit moment zeer beperkt is, dat deze kennis noodzakelijk is voor het ontwikkelen van nieuwe behandelmogelijkheden en dat er behoefte is aan nieuwe behandelmogelijkheden. Naar de mening van de DEC is het doel van deze projectaanvraag daarom gerechtvaardigd binnen de context van het onderzoeksveld.

5. De belangrijkste belanghebbenden in deze projectaanvraag zijn de proefdieren, de onderzoekers en de doelgroep/patiënten.

Voor de proefdieren geldt dat hun welzijn en integriteit worden aangetast. De dieren zullen beperkt worden in hun natuurlijke gedrag en gedurende de proeven zullen de dieren stress ondervinden en pijn ondergaan. Uiteindelijk zullen ze in het kader van het onderzoek gedood worden. De dieren hebben er belang bij hiervan gevrijwaard te blijven.

Voor de onderzoekers geldt dat het publiceren van belangrijke nieuwe wetenschappelijke inzichten resulteert in een goede wetenschappelijke reputatie, hetgeen vaak de sleutel is voor het verkrijgen van nieuwe onderzoeksmiddelen en mogelijkheden. Dit kan door de onderzoeker zelf van belang geacht worden, maar dient naar de mening van de DEC geen rol te spelen in de ethische afweging over de toelaatbaarheid van het gebruik van proefdieren. Het gaat uiteindelijk om de vraag of dit onderzoek belangrijke maatschappelijke en wetenschappelijke doelen dient (gezondheid, kennis).

Voor patiënten is dit onderzoek op de lange termijn van belang, omdat het kan bijdragen aan een verbetering van hun gezondheid en kwaliteit van leven. Gerichtte behandeling op basis van mechanistisch inzicht kan bijdragen aan een betere diagnostiek en behandeling met minder bijwerkingen. Dit kan er toe leiden dat de patiënt langer ziektevrij kan overleven omdat uitzaaiingen kunnen worden voorkomen, dan wel een betere kwaliteit van leven heeft. Kunnen beschikken over adequate behandelingen voor ernstige ziekten, zoals uitzaaiende kanker, is van groot belang voor de samenleving.

6. Er is geen aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken.

Proefopzet en haalbaarheid

7. De kennis en kunde van de onderzoeksgroep en andere betrokkenen bij de dierproeven zijn voldoende gewaarborgd. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager, zoals blijkt uit de in de aanvraag vermelde publicaties van deze onderzoeksgroep. De aanvragers beschikken over voldoende kennis en kunde om te kunnen voldoen aan alle zorgvuldigheidseisen omtrent het verrichten van dierproeven.
8. De doelstellingen van het project zijn realistisch en de voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters sluiten hier logisch bij aan. Bovendien heeft deze groep veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC is dan ook van mening dat het project goed is opgezet, en dat deze strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project.

Welzijn dieren

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

omstandigheden of behandeling van de dieren:

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

10. De huisvesting en verzorging van de dieren zijn conform de eisen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU.
11. Het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd.
12. De integriteit van dieren wordt aangetast door het aanbrengen van een raamwerk op het lichaam van de muis waardoor het weefsel daarbinnen makkelijker bereikbaar is voor imaging. De dieren hebben hier in de praktijk weinig hinder van. Er zullen mogelijk naakte muizen gebruikt worden, omdat humane tumorcellen en tumorcellijnen waarin GFP tot expressie komt in deze dieren kunnen groeien. De integriteit van deze dieren is aangetast omdat zij geen vacht hebben.
13. De criteria voor humane eindpunten zijn voldoende specifiek gedefinieerd en toegesneden op het experiment. Het percentage dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal bereiken is op basis van ervaring met deze diermodellen ingeschat. De commissie is het eens met deze inschatting en de gehanteerde humane eindpunten.

3V's

14. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn. De onderdelen van het onderzoek die met in vitro modellen kunnen worden uitgevoerd zijn al afgerond. Voor het beantwoorden van de resterende onderzoeksvragen zijn dierproeven noodzakelijk. De wederzijdse interacties tussen tumorcellen en omringende weefsels tijdens de verschillende stadia van metastasering kunnen niet goed nagebootst worden zonder proefdiermodellen.
15. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en is proportioneel ten opzichte van de gekozen onderzoeksopzet en de looptijd. De onderzoekers hanteren een goede strategie om ervoor te zorgen dat er met het kleinst mogelijke aantal dieren wordt gewerkt waarmee nog een wetenschappelijk betrouwbaar resultaat kan worden verkregen. Waar mogelijk worden meerdere procedures bij hetzelfde dier uitgevoerd. Door gebruik te maken van niet-invasieve metingen (ondermeer met behulp van het raamwerk) kan het gedrag van tumorcellen op meerdere tijdstippen in hetzelfde dier bepaald worden. Deze proefopzet draagt bij aan een vermindering van het aantal benodigde dieren.
16. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de verfijning van dierproeven. Het tumor micromilieu in muizen komt voldoende overeen met de humane situatie, en er zijn voldoende research tools beschikbaar voor deze diersoort. De aanvragers zullen adequate pijnbestrijding toepassen voor de handelingen waarvoor dit vereist is. De DEC is ervan overtuigd dat de

beschreven proefopzet de meest verfijnde is en dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

17. Het betreft geen wettelijk vereist onderzoek.

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. De aanvrager zal in het project alleen gebruik maken van vrouwelijke dieren. De aanvrager geeft hiervoor de volgende onderbouwing: 'Aangezien er vrouwelijke borstkankercellen onderzocht worden, zullen we vrouwelijke muizen gebruiken. Om ervoor te zorgen dat de ontwikkeling van de borstklier is voltooid zullen we alleen muizen ouder dan zes weken gebruiken.' De DEC is van mening dat de aanvrager in voldoende mate heeft onderbouwd dat het om de doelstellingen met zo min mogelijk dieren te bereiken noodzakelijk is om de proeven met alleen vrouwelijke dieren uit te voeren.
19. De dieren zullen in het kader van het project gedood worden. Dit is noodzakelijk om verschillende weefsels te kunnen onderzoeken voor het beantwoorden van bepaalde onderzoeksvragen. De gebruikte dodingsmethode staat vermeld in bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU.
20. Er worden in deze projectaanvraag geen landbouwhuisdieren, honden, katten of niet-humane primaten gebruikt (en dus ook niet gedood om niet-wetenschappelijke redenen).

NTS

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

D. Ethische afweging

1. Rechtvaardigt het belang van de doelstelling van het project het ongerief dat de dieren wordt aangedaan, en is aan alle zorgvuldigheidseisen (3V's) voldaan?
2. Er vindt een lichte of matige aantasting van welzijn en integriteit van de proefdieren plaats (beschreven in C9 tot C20). De doelstellingen kunnen niet zonder dieren behaald worden. De onderzoekers doen al het mogelijke om het lijden van de dieren en het aantal dieren te beperken.
Voor de vooruitgang in dit onderzoeksveld is dit onderzoek van belang, omdat het er toe zou kunnen bijdragen dat de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij de verschillende stappen van het uitzaaiingsproces worden opgehelderd. De DEC kent daar veel gewicht aan toe om de volgende redenen. Sterfte aan borstkanker en andere carcinomen wordt veroorzaakt door uitzaaiingen van de primaire tumor. Er is nog geen therapie beschikbaar om de vorming van metastasen te verminderen. Wanneer de moleculaire mechanismen die betrokken zijn bij de verschillende stappen van het uitzaaiingsproces zijn opgehelderd, zou dit kunnen bijdragen aan het ontwikkelen van een therapie om de vorming van metastasen te verminderen of te voorkomen. Het is aannemelijk dat de kennis die dit project oplevert op termijn kan bijdragen aan het ontwikkelen van zo'n therapie. De commissie acht het voorkomen of verminderen van uitzaaiingen van carcinomen van substantieel belang.

3. De DEC is overtuigd van het belang van de doelstellingen: het ophelderen van de rollen van [REDACTED] en van [REDACTED] in de verschillende stappen van invasie en metastasering van borstkankercellen in diermodellen. Het uiteindelijke doel is om de vorming van uitzaaiingen bij (borst)kankerpatiënten te voorkomen of af te remmen. De DEC is van mening dat de belangen van de patiënten voldoende zwaar wegen om het schaden van de belangen van de proefdieren (om gevrijwaard te blijven van een aantasting van hun welzijn en integriteit) te rechtvaardigen. De commissie is overtuigd van de kwaliteit van het werk van de aanvrager. De DEC is van mening dat het project goed is opgezet, en dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. De aanvrager heeft voldoende aannemelijk gemaakt dat er geen geschikte vervangingsalternatieven zijn, dat het doel niet met minder dieren behaald kan worden, dat de gebruikte aanpak de meest verfijnde is en dat zij zal kunnen voorkomen dat mens, dier en het milieu onbedoelde negatieve effecten ondervinden als gevolg van de dierproeven.
- De DEC is van oordeel dat het hier boven geschetste belang de onvermijdelijke nadelige gevolgen van dit onderzoek voor de dieren, in de vorm van angst, pijn of stress, rechtvaardigt. Aan de eis dat het belang van de experimenten op dient te wegen tegen het ongerief dat de dieren wordt berokkend, is voldaan.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

- Op grond van het wettelijk vereiste dient de projectleider bij beëindiging van het project een beoordeling achteraf aan te leveren die is afgestemd met de IvD.
- Voor de uitvoering van dit project is tevens ministeriële ontheffing vereist
- Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden, te weten...

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

- De vaststelling dat het project niet vergunningplichtig is om de volgende redenen:...
- De volgende doorslaggevende ethische bezwaren:...
- De volgende tekortkomingen in de aanvraag:...

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

3. Er zijn geen knelpunten of dilemma's geconstateerd – zowel binnen als buiten de context van het project - die de verantwoordelijkheid en competentie van de DEC overstijgen.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Dhr. Instantie voor dierenwelzijn
Postbus 9101, [REDACTED]
6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020172004

Bijlagen

2

Datum 2 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer Instantie voor dierenwelzijn,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 juni 2017. Het gaat om uw project "Dynamic intravital imaging of breast cancer cell invasion and metastasis". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1030020172004. 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:

2 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020172004

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur

Datum:
2 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020172004

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300
Naam instelling of organisatie: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: Dhr. Instantie voor dierenwelzijn
KvK-nummer: 41055629
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10
Postbus: 9101, [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
IBAN: NL90ABNA0231209983
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
2 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020172004

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

Functie: Instantievoor Dierenwelzijn
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 juli 2017
Geplande einddatum: 1 juli 2022
Titel project: Dynamic intravital imaging of breast cancer cell invasion and metastasis
Titel niet-technische samenvatting: De invloed van cel-cel adhesie eiwitten op het uitzaaiingsproces van borstkanker
Naam DEC: RU DEC
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]
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: Instantie voor dierenwelzijn
Plaats: Nijmegen
Datum: 1 juni 2017



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Instantie voor dierenwelzijn

Postbus 9101, [REDACTED]

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020172004

Bijlagen

2

Datum 2 juni 2017

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 2 juni 2017

Vervaldatum: 2 juli 2017

Factuurnummer: 172004

Ordernummer: 040823-461220 /2017-0005 / [REDACTED]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1030020172004	€ 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

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Dhr. Instantie voor dierenwelzijn
Postbus 9101, [REDACTED]
6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie
Dierproeven**

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

Onze referentie

Aanvraagnummer
AVD1030020172004

Datum 19 juni 2017
Betreft aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer Instantie voor dierenwelzijn,

Op 1 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Dynamic intravital imaging of breast cancer cell invasion and metastasis" met aanvraagnummer AVD1030020172004. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

Welke informatie nog nodig

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

Onduidelijkheden

In Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 heeft u niet aangegeven hoeveel dieren naar verwachting een humaan eindpunt zullen halen. Kunt u een nieuwe Bijlage Dierproeven sturen waarin dit is aangegeven? Kunt u hierin ook aanpassen hoeveel dieren welke ongeriefsclassificatie zullen ondergaan?

Onder I staat voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 dezelfde tekst, terwijl in Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 de dieren niet meerdere keren onder narcose gaan. Kunt u dit uitleggen, of aanpassen in de Bijlage Dierproeven?

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:

19 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1030020172004

Wanneer een beslissing

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

Meer informatie

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Aan de CCD
Geachte mw/hr,

In reactie op uw brief van 19 juni (referentie Aanvraagnummer AVD1030020172004) sturen we hierbij de antwoorden op de gestelde vragen en de aangepaste DAPs op.

Vragen/ antwoorden

In Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 heeft u niet aangegeven hoeveel dieren naar verwachting een humaan eindpunt zullen halen. Kunt u een nieuwe Bijlage Dierproeven sturen waarin dit is aangegeven? Kunt u hierin ook aanpassen hoeveel dieren welke ongeriefsclassificatie zullen ondergaan?

De gevraagde informatie is toegevoegd aan Bijlage Dierproeven 3.4.4.1, onder J.

Onder I staat voor Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 dezelfde tekst, terwijl in Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 de dieren niet meerdere keren onder narcose gaan. Kunt u dit uitleggen, of aanpassen in de Bijlage Dierproeven? Per ongeluk was dezelfde tekst gezet in 3.4.4.1 I en 3.4.4.2 I. Dit is aangepast.

Vriendelijke groet,

De onderzoeker:

[redacted] MSc

PhD-student

[redacted]

Visiting address: [redacted], Nijmegen

Postal address: P.O. Box 9101, 6500 HB Nijmegen

The Netherlands

Phone: [redacted]



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
T.a.v. Instantie voor Dierenwelzijn
Postbus 9101
6500 HB NIJMEGEN


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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1030020172004
Bijlagen
1

04 JUL 2017

Datum 3 juli 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Op 1 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Dynamic intravital imaging of breast cancer cell invasion and metastasis" met aanvraagnummer AVD1030020172004. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 29 juni 2017 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof het aantal dieren dat naar verwachting een humaan eindpunt zal halen, het aantal dieren per ongeriefscategorie in Bijlage Dierproeven 3.4.4.1 en de tekst betreffende overige welzijnsaantasting.

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 "Dynamic intravital imaging of breast cancer cell invasion and metastasis" starten. De vergunning wordt afgegeven van 3 juli 2017 tot en met 1 juli 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU DEC gevoegd. Dit advies is opgesteld op 1 juni 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:
3 juli 2017
Aanvraagnummer:
AVD1030020172004

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


Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen
Adres: Postbus 9101, [REDACTED]
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 3 juli 2017 tot en met 1 juli 2022, voor het project "Dynamic intravital imaging of breast cancer cell invasion and metastasis" met aanvraagnummer AVD1030020172004, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU DEC. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is PhD-student. Voor de uitvoering van het project is Instantie voor Dierenwelzijn verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 1 juni 2017
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
 - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 juni 2017;
 - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 juni 2017;
 - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 1 juni 2017, ontvangen op 1 juni 2017.
 - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 29 juni 2017

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1 Longitudinal metastasis study of breast cancer cells after orthotopic implantation				
	Muizen (Mus musculus) /	267	15% Matig 85% Licht	
3.4.4.2 Intravital imaging of breast cancer invasion				
	Muizen (Mus musculus) /	275	Matig	

Voorwaarden

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

Aanvraagnummer:
AVD1030020172004

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:
AVD1030020172004

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 onvereenigbaar is met het doel van de dierproef. Bij een dier wordt geen stof toegediend waardoor het dier niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende verdoving of pijnstilling krijgt toegediend, tenzij wetenschappelijk gemotiveerd. Dieren die pijn

Aanvraagnummer:
AVD1030020172004

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

Einde van een dierproef

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

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

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

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

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

Inventaris Wob-verzoek W17-12									
nr.	documenten NTS20172044	wordt verstrekt				weigeringsgronden			
		reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x		x	x	
7	Bijlage beschrijving dierproeven 4				x		x	x	
8	DEC-advies				x		x	x	
9	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
10	Advies CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x	x	



09 JUNI 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	11400
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Vrije Universiteit Medisch Centrum (VUmc) te Amsterdam
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	64156338
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	de Boelelaan 1117
		Postbus	
		Postcode en plaats	1081HV Amsterdam
		IBAN	
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Teléfonoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Teléfonoonnummer	[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 oktober 2017 |
| Einddatum | 30 september 2022 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Experimental therapeutic transplantation of stem-cell derived retinal pigment epithelial cells in animal models for retinal degeneration.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De experimentele therapeutische transplantatie van stamcel-retinaal pigment epitheel in diermodellen voor retinale degeneratie.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- | | |
|-------------|---|
| Naam DEC | DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum |
| Postadres | Amsterdam Nederland |
| E-mailadres | |

4 Betaalgegevens

4.1 Om welk type aanvraag gaat het?

Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 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.

Factuur graag opsturen naar:



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

Amsterdam

Datum

07 - 06 - 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'. 11400
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment. VUmc
- 1.3 Provide the title of the project. Experimental therapeutic transplantation of stem-cell derived retinal pigment epithelial cells in animal models for retinal degeneration

2 Categories

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

3 General description of the project

3.1 Background

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

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

Background information

Genetic blindness.

Millions of people are estimated to be visually impaired worldwide. In the Netherlands, about 50,000 people are affected with hereditary blindness caused by a single disease gene such as Retinitis Pigmentosa (RP). Over 350,000 people are affected with a more complex, visual disability such as age-related macular degeneration (AMD), where both multiple genes and environmental factors play a role.

The retinal pigment epithelium (RPE).

The RPE is a multi-functional neuro-epithelial cell layer located between the photoreceptors (rods and cones) and the choroid (the blood vessels). The RPE ensures that the visual cycle remains active and forms the barrier between the choroidal blood vessels and the cell layers of the retina. In summary, the RPE layer is essential for visual function.

Disorders of the RPE: Retinitis Pigmentosa (RP) and age-related macular degeneration (AMD).

RP (or tunnel vision) is a hereditary progressive retinal disease, with a frequency of 1 in 4,000 humans. It mainly affects children or young adults. A subset of patients have a mutation in a gene with RPE-specific expression, [REDACTED]. Biochemically, both genes play a role in feeding and maintaining the signal transduction cascade in the retina. Local oxidative stress in the RPE, [REDACTED] degeneration.

AMD is a progressive degenerative retinal disease, which affects 4% of the population over 60, and 15% above 70 years of age. Early AMD is characterized by the development of so-called drusen (abnormally accumulating metabolic waste material) under the RPE cell layer and a slowly less functioning RPE. In the later stage, AMD can be divided in geographic atrophy (dry AMD), or neovascularization of the choroid (wet AMD). The dry form of AMD is characterized by the presence of drusen (at the macula) and a slowly deteriorating RPE function. The wet form of AMD occurs in only 10% of all AMD patients and is characterized by extensive growth of new leaky choroidal blood vessels, which disrupt the blood-retina barrier and damage the retinal neural tissue.

Both environmental factors such as age, smoking and diet and genetic factors affect the disease. Recent genetic genome-wide association studies indicate at least nineteen candidate AMD genes.

Experimental treatments of disorders of the RPE: RP and AMD

After obtaining proof-of principle in mice, RPE65 gene therapy clinical trials are currently ongoing in the form of *in vivo* gene therapy, and dietary vitamin A-derivative supplementation. However, both experimental treatments currently suffer from side effects and drawbacks: While initially successful, intra-ocular injections of a relevant adeno-associated virus, RPE65 gene therapy resulted in only approximately 60-70% transduction of cells in the target area. The remainder of the cells is either killed, not transduced, not cured and continues to degenerate. The systemic supplement of retinoids in clinical trials have been controversial given their potential toxicity. Indeed, in the ongoing clinical trial with a chemically modified oral retinoid in RPE65 patients, patients suffer from severe headaches. [REDACTED]

Currently, there is no effective or fully approved treatment for the most common (dry) form of AMD. For the wet form (two-) monthly intra-ocular injections with anti-VEGF medication, photodynamic therapy and laser treatments are frequently given to prevent (further) neovascularization. The effectiveness of the treatments vary between patients.

A new development: [REDACTED] degenerative diseases of the RPE

As summarized above, all relevant current RPE treatments of RP and AMD, except for the rare wet AMD type, are ineffective, patient-unfriendly and mostly require living cells. Sometimes, they prevent further loss of vision. **However, once RPE cells (and vision) are lost, there is no alternative to replace the RPE.** These experimental transplantations of the RPE are inefficient, mainly due to limited availability of suitable (autologous) donor material. [REDACTED]

Previously, at least two research groups reported some functional visual improvement in (blind) mice or rats [REDACTED]

Our preliminary work

Over the last years the research of our group focused [REDACTED]

[REDACTED]

foreign work visits.

In our lab we set up and gained experience with a brand-new, noninvasive, ocular screenings facility for small animals. This includes optical coherence tomography (OCT), scanning laser ophthalmoscopy (SLO) and Electroretinograms (ERG) screenings. We also set up an ocular injection and surgery unit for mice and rats. All these techniques and facilities are now operational and form a single pipeline [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED] to human clinical trials.

We are convinced that there is no other solution than the use of animals for such experiments. The use of our non-invasive screening facility minimizes the number of animals used and animal discomfort as much as possible.

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 overall aim of our project is [REDACTED] in suitable animal models of retinal degeneration, in order to gain a much more prolonged and improved functional recovery (>50%). We recently showed that the molecular signature of *in vivo* [REDACTED] shows substantial differences, but we do not know whether this has also functional consequences. In the literature and our hands, injected dissociated [REDACTED]

such as some types of RP, and AMD.

The main aim of [REDACTED] RPE cells in animal models for retinal degenerative disease in order to gain an improved functional recovery. A number of sub-aims support this main aim:

1. What is the exact onset and progression of visual impairment in our non-treated AMD animal models compared to normal vision in wild type controls (rat, mice)?
2. What is the onset and progression of visual impairment in our treated animal models compared to not-treated animals?
3. Is our [REDACTED] safe and efficient over a prolonged period of time?
4. Can we combine our [REDACTED]
5. Can we use our [REDACTED]

[REDACTED]

We will measure and follow-up the onset and progression of retinal degeneration in our non-treated [REDACTED] models non-invasively by OCT, SLO and ERG measurements. These examinations are essential to establish a baseline for retinal degeneration in our treated and not-treated animal models.

With the investigation of these research questions we aim to set an essential step towards the use [REDACTED] trials in AMD and some forms of RP.

The feasibility of the project

This project is a logical progression with a refinement and improvement of our own experiments and those already published research in the peer reviewed literature. With the injection of single RPE cell suspensions in a mouse or rat model, variable rates of visual improvement will be observed, as measured by ERG and immunohistochemistry.

We have sufficient manpower, expertise and resources to carry out this project successfully. We recently installed a new facility to screen small animals non-invasively by OCT, SLO and ERG. This technology allows us to follow the animals over time and to measure the visual activity of the animals. Over the past few years we have gained the skills to operate these machines and mastered [REDACTED]

This research plan has been scientifically examined and our expertise is visible in the articles which are published in several scientific journals. Apart from our own expertise we have made highly relevant work visits to/collaborations. We also followed several courses, such as SLO/OCT, ERG handling and mouse microsurgery.

3.3 Relevance

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

The scientific importance consists mainly of further investigations of the molecular and functional characteristics of the RPE and the retina. We will also gradually learn much about interaction of RPE with photoreceptors (and retina), the [REDACTED] will open up a lot of possibilities to study possible treatments of retinal degeneration similar diseases.

The social importance is, as mentioned above, huge. The Netherlands have about 50,000 people with monogenic hereditary blindness and 350,000 people with a more complex form of genetically determined blindness. Monogenic blindness (caused by a mutation in one gene), such as RP, mainly affects children, who suffer from their handicap for their entire life. Complex blindness, such as AMD, severely affects the quality of life of older people and they will therefore lose progressively a significant proportion of their autonomy. Up to now there is no effective, efficient and long-lasting treatment for both diseases. Our proposed transplantation strategy might provide one.

3.4 Research strategy

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

[REDACTED]. After transplantation, we will compare the onset and progression of disease and rate of recovery among the different approaches, with the aim to select the best experimental therapeutic strategy.

[REDACTED] We will next follow the onset and progression of pathology non-invasively by OCT, SLO and ERG, and eventually immunohistochemistry. [REDACTED]

Obviously, from the combined experiments above, we will gain a vast amount of data about potential ocular infections (despite the ocular immune privilege), uncontrolled cell growth [REDACTED] and success or failure rates. We will continuously assess these data to determine part of the safety and utility of this approach in concrete numbers.

For the complex disorder AMD, [REDACTED], in order to postpone the onset or progression of this age-related disease for 10-20 years. In contrast, disorders caused by one mutation in a single gene occur much earlier in life and [REDACTED]. Currently, injection gene therapy is not satisfactorily. [REDACTED]

[REDACTED] from RP patients with a defect in a single gene [REDACTED] (available from collaborators). Next, [REDACTED] and we follow the onset and progression in time using Optical Coherence Tomography (OCT), Scanning Laser Ophthalmoscopy (SLO) and Electroretinograms (ERG) (please find explanations of the techniques below). [REDACTED]

Animal models used in this study

[REDACTED] This method has proven previously to be successful in larger animals, and, [REDACTED]. Injection with higher concentration [REDACTED], and invokes a currently undesirable phenotype including neovascularization. [REDACTED]

For our experiments it is essential to distinguish between (partial) RPE function of the host [REDACTED]. Therefore, we will inject the [REDACTED]. This is a host in which the [REDACTED] due to [REDACTED]. In contrast, the transplanted RPE cells do carry an active gene. Consequently, [REDACTED] (2). This functionality of the visual cycle can be measured by ERG. In addition, safety studies will be performed in wildtype animals (3) as a control.

The use of the [REDACTED] rat provides us also with an interesting spin-off possibility. It is expected that these animals by themselves, [REDACTED] and only after prolonged [REDACTED], develop (not AMD but) RPE related photoreceptor degeneration. Gene therapy by direct ocular injection for this disorder yields limited results, most likely due to low transfection efficiency *in vivo*. [REDACTED] [REDACTED] also in mice (5), for which a diversity of other models for the numerous types of RP are available.

Mice and rats are ideal animal models for this type of research, because they are mammals and therefore phylogenetically closely related to humans, yet also uniquely amendable to genetic modifications. In addition, the morphology of their eye closely relates to that of humans and the eyes show functionally a high similarity. Since the size of the rat eye is bigger than a mouse eye, the rat might be a better option to perform complex therapies which contain [REDACTED]. However, only few transgenic rat lines exist, which can be used for ophthalmology research. In mice, quite a few genetic lines already exist. This is a major advantage of the mouse as animal model in this project. This is why we will aim for a procedure which works in rats (advantage: bigger eye, disadvantage: no broad availability of transgenic lines) and mice (advantage: multiple models, disadvantage: small eye, pilot first).

Below we list the advantages and disadvantages of rat and mouse models.

	Rat	Mouse
Advantages	<ul style="list-style-type: none"> • Eyes are bigger and hence more approachable • [REDACTED] • Data less error-prone (less failure of transfer) 	<ul style="list-style-type: none"> • Numerous models available For both monogenic and complex disease • More relevant data available in literature • New models made routinely
Disadvantages	<ul style="list-style-type: none"> • Only one/two genetic modes and one chemical model available. • Less transfer data (of cell suspension transfer) available in literature. • Little routine in new model construction 	<ul style="list-style-type: none"> • Very small eyes (less than an pea) • [REDACTED] techniques, if possible, need to be further established • Error rate (even with ocular injections: quite high)

Figure 1. Advantages and disadvantages of the rat and mouse models.

General methods

Depending on the research question asked, we will use two different methods of [REDACTED]: (1) [REDACTED]; or (2) [REDACTED]. To investigate [REDACTED] [REDACTED] are harmless for the host animals.

[REDACTED] method 1: [REDACTED]

Essentially, [REDACTED]. We are currently looking into the possibility to improve the existing protocol of this procedure by introducing new equipment. [REDACTED] will be used as a control to compare the new [REDACTED] to.

[REDACTED] method 2: [REDACTED]

Through work visits, we recently learned [REDACTED] in human, rabbits and rats. [REDACTED] in humans and rabbits is highly comparable, and is carried out with the same instruments and methodology. Given the small size of the eye, [REDACTED] in the rat is more complicated. The smallest sized instruments commercially available are being used. This technique requires more handlings than [REDACTED]. This is the case because [REDACTED]. In summary, [REDACTED].

Scanning Laser Ophthalmoscope (SLO) and Optical Coherence Tomography (OCT)

SLO and OCT are techniques which are used for scanning of the eye and retina structures, also in humans. Both are relatively new techniques, which are non-invasive and completely harmless. A few modifications to the clinical apparatus used, were made, [REDACTED]. In summary, a small laser beam beams through the pupil and scans the back of the eye (SLO) or it scans, layer by layer, through a section of the retina (OCT).

Electroretinogram (ERG)

Using an ERG machine one measurers, noninvasively, the response of the retina to electrical micro responses generated by the retina after flashes of light. Many layers of the retina yield a specific signal on the electroretinogram.

In vitro analyses

At the end of the follow-up experiments, the animals will be sacrificed and the eyes will be enucleated. All tissues will be used for further *in vitro* analyses.

Timeline

Table 1 shows an estimated timeline for the project.

Table 1 An estimated timeline which divides the experimental procedures over five years. Breeding (appendix 1) will be done by the animal facility during Year 1-4. Year 5 will be used when experiments take more time than expected. In Year 1 we will set-up and optimize our non-invasive screening facility for mouse and rat. This includes the use of SLO, OCT, ERG and behavioral assays. Next, we will screen our animal models to answer question 1. [redacted] methods will also be set up in Year 1. We expect to start the first experiments from appendix 3 in Year 2. We will then [redacted] in rat models and follow-up all animals which are in the experiments. At the end of all experiments, the animals will be sacrificed and tissues will be harvested for in vitro analyses. Year 3 will be used for the further [redacted] in rats and the start of appendix 4 [redacted]. This is followed by the [redacted] which is described in appendix 3 (in mice or rats). Year 4 will be used to finalize [redacted] and to finalize all follow-up measurements and safety.

Year 1	Year 2	Year 3	Year 4	Year 5
Breeding	Breeding	Breeding	Breeding	Describe and publish results
Setup non-invasive screening methods for mouse and rat.	[redacted] in rat models	Introduce the mouse as a model. [redacted]	Determine safety of procedures. Follow-up of all experimental animals.	Harvest eyes and tissues and perform <i>in vitro</i> analyses
Screening of animal models.	Follow-up of the animals which are in the experiments.	[redacted]	Harvest eyes and tissues and perform <i>in vitro</i> analyses	
Set-up [redacted] in rats.	Harvest eyes and tissues and perform <i>in vitro</i> analyses.	Harvest eyes and tissues and perform <i>in vitro</i> analyses		

Within the project the following questions are addressed:

1. What is the exact onset and progression of visual impairment in our non-treated AMD animal models compared to normal vision in wild type controls (rat, mice)?
2. What is the onset and progression of visual impairment in our treated animal models compared to not-treated animals?
3. [redacted] safe and efficient over a prolonged period of time?
4. [redacted] retinal diseases of the RPE (i.e. certain types of RP) efficiently?
5. [redacted]

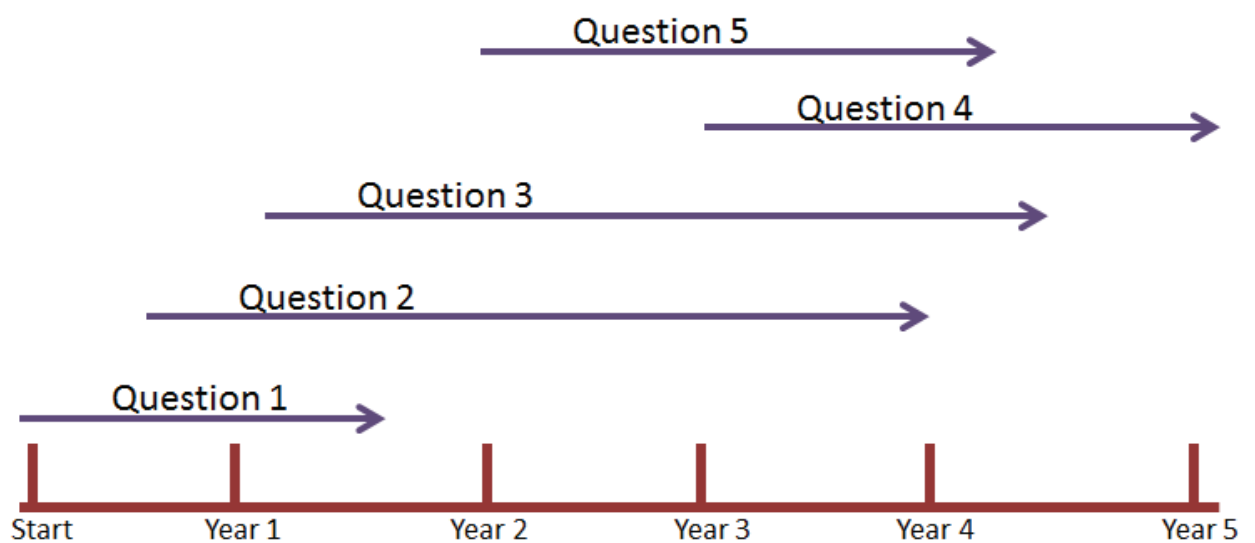


Figure 2. An estimated timeline of the project. The questions which are addressed in this project are schematically divided over the five years. Question 1 will be addressed at the beginning of the project. Our follow-up of the experimental animals which received a [redacted] will take approximately 3.5 years (question 2 and 3). Once we are confident in [redacted] (question 5; appendix 4). Once we have an answer to question 5, we will start to work on [redacted] (question 4). Preparations for this will be done on forehand.

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 experiments which are described in this document will be performed in different animal experiments described below.

Breeding and phenotyping the experimental animals (appendix 1).

We will need genetically modified animals (breeding with discomfort) for our experiments. The genes which are knocked out in these models are essential for normal vision. Therefore, the experimental animals will be (partly) blind. Because of this visual impairment, this is breeding with discomfort. The animals will be used in the experiments which are described in appendices 2-4. [redacted]. This will be done by SLO, OCT, ERG measurements and visual behavioural analyses.

[redacted] (appendix 2).

[redacted] is partly set-up and needs to be optimized. This is still an experimental procedure. Therefore, we will start the experiments in this appendix with animals which will be terminated after the procedure. If we are confident that the procedures will not leave any (long term) damage to the eye, the animals are allowed to wake up and the effects are examined after a few days. [redacted] is well defined, and we have sufficient experience in that area.

[redacted] in animal models for retinal degenerative diseases and its safety (appendix 3).

Once the [redacted] is setup in wild type healthy rat (or mouse) we will proceed to the experimental animals. These animals will have a defect in their retina. This is either caused [redacted] will be performed:

In summary, the animals will undergo baseline measurements using the non-invasive techniques SLO, OCT and ERG. [redacted] in one of the two eyes. The other eyes will serve as a control eye. The animals will be screened again by SLO, OCT and ERG a few days [redacted]. The animals will be followed with the same visual screenings techniques for a maximum period of a year after transplantation. We will also perform visual behavioral experiments. [redacted]

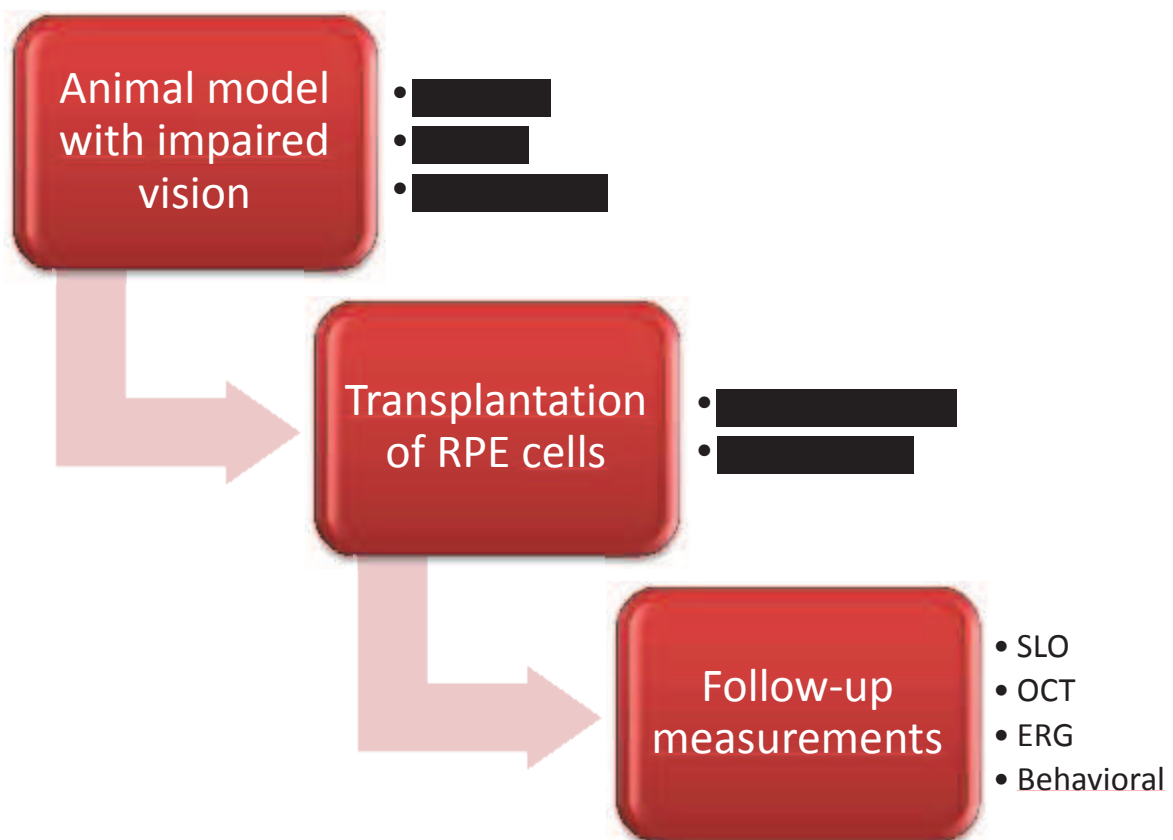


Figure 3. A flowchart of the general experimental setup. We will start with an animal model (mouse or rat) with an impaired vision [Redacted]. As an intervention we will [Redacted]. [Redacted]. After this, the animals will be followed over time with our non-invasive screening methods (SLO, OCT, ERG and behavioral assays). Appendix 1: breeding and phenotyping. For the phenotyping of the animals we will only perform "follow-up" measurements without an intervention. Appendix 2: [Redacted] and follow-up. Same goes for appendix 4, but in that case [Redacted] will be used. The animals from appendix 3 will undergo this entire flowchart.

[Redacted] (set-up method) (appendix 4). [Redacted] is not yet performed [Redacted] and needs to be set up. In the first place, we will use animals which will be terminated after the procedure. Once we are confident that the procedure will not leave long term damage to the animal, we will allow the animals to wake up after anaesthesia and judge within the next few days whether the [Redacted] was a success. The animals will be monitored with the non-invasive techniques SLO, OCT, ERG and behavioural experiments. Once we book success, we will start performing in the first disease model. [Redacted]. We will practice this technique a few times and reach a success rate of at least 60%. We will expect little complications with this technique.

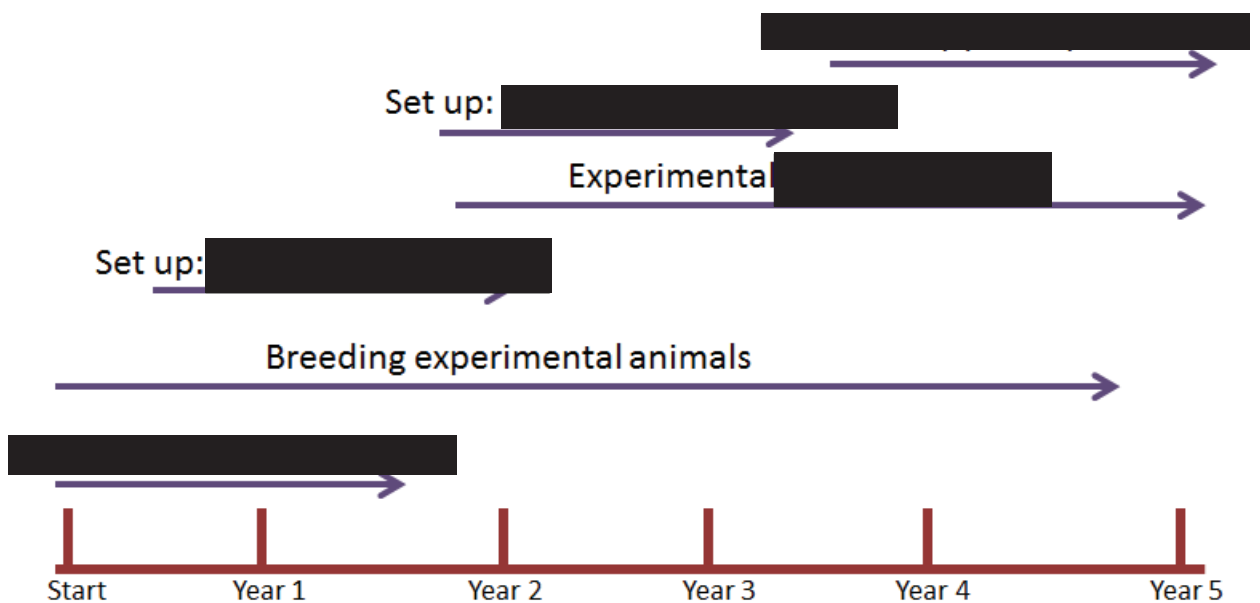


Figure 4. An estimated timeline of the project. The [redacted] appendix 1) will be done from the start of the project. We expect to breed animals over almost the entire course of the project (appendix 1). The set-up of the [redacted] (appendix 2) will start, shortly after the start of the [redacted] just before the start of year 2, we expect to start the experimental [redacted] (appendix 3). Simultaneously we will explore the possibility of the use of mice (appendix 4). Once we know whether mice are a possibility, we will start [redacted] [redacted] (question 4, appendix 3).

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

All the above mentioned experiments serve a common goal: to [redacted] [redacted]. We use different sources [redacted] and quality of visual behavior in different animal models as primary outcomes. In order to monitor the efficacy of the phenotype as a whole, as well as in sub phenotypes (remember, AMD is a heterogeneous disease!). Unfortunately, only a few (genetic) phenotypes are currently available in rats, while several disease models with relevant sub phenotypes are available in mice.

The experiments will result in a “best” procedure for [redacted] in AMD, which, eventually, can be tested in the next phase: human clinical trials. Prior to this project, we have performed enough research to take this next step. We think that the project will obtain enough important information to be approved. We are convinced that we can answer the questions, which are described in all sections above, within the given five years of this project.

Go/no-go moments

Since this project involves an experimental [redacted] procedure, clear go/no-go moments are built into the pipeline. After each answered research question we will check whether the next one is still relevant. The research strategy will be adapted if necessary, depending on the results obtained. Obviously, if, over time an experiment is not relevant anymore it will not be carried out.

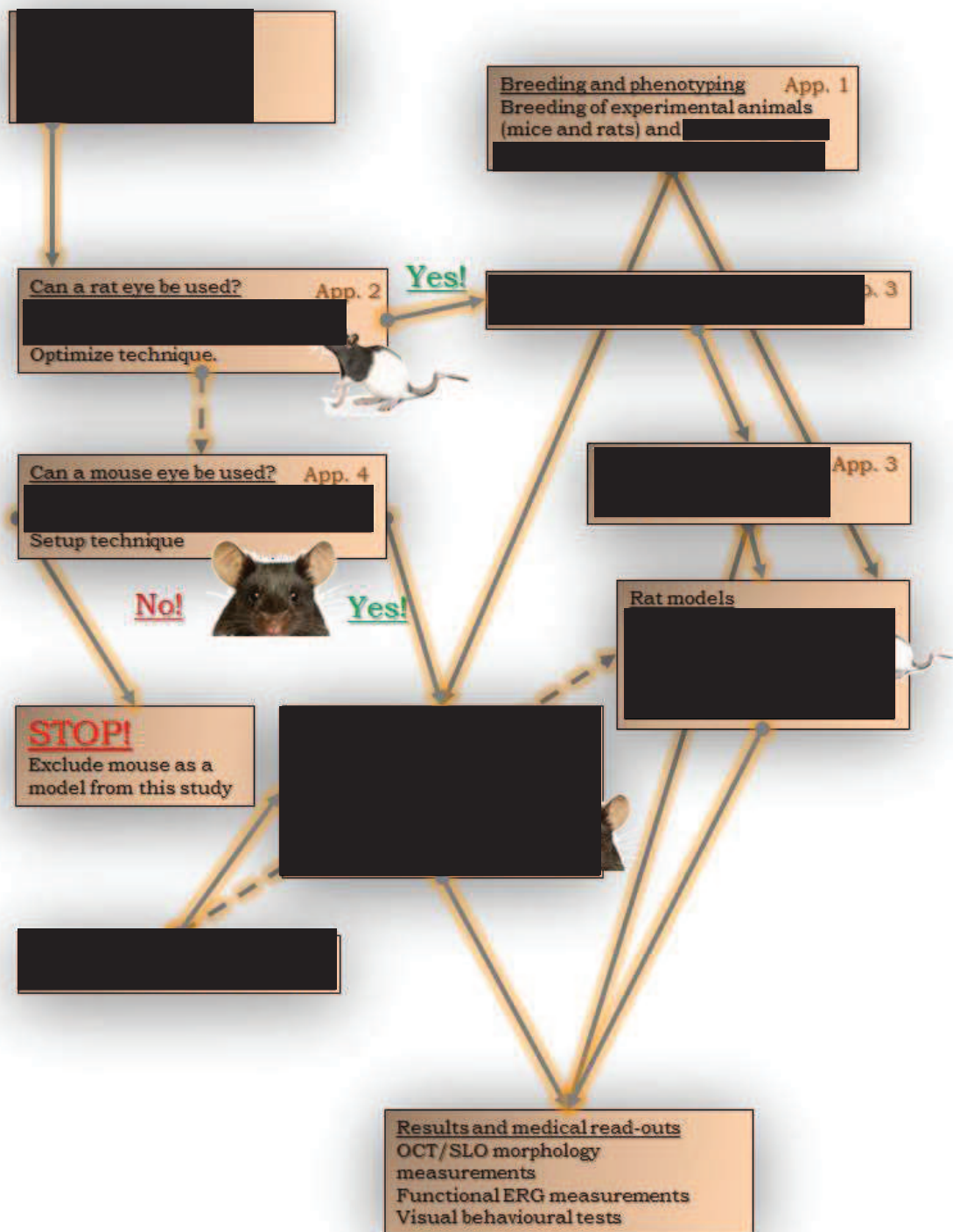


Figure 5. Flowchart stating our go and no-go moments. We will start our [redacted]. We expect that the [redacted] is technically possible (appendix 2). Once we find the best [redacted], we will compare [redacted]. Our [redacted] model will be used, [redacted] and [redacted] will be used. All results will be in the form of OCT, SLO and ERG measurements and behavioral assays. We will start

examining whether the mouse is a possibility for our transplantation procedure once we have sufficient experience in the rat. This pilot will have a clear GO or NO GO moment. If we don't succeed we will exclude the mouse from our studies. If we do succeed we will test [REDACTED] We will obtain the same read-outs as we do for rats. Meanwhile, we will perform our [REDACTED] in either mouse or rat depending on the outcome of appendix 4.

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	Breeding and phenotyping the experimental animals.
2	[REDACTED] procedure [REDACTED]
3	[REDACTED] for retinal degenerative diseases and its safety.
4	PILOT: [REDACTED] (set-up method).
5	
6	
7	
8	
9	
10	



Appendix Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11400	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	VUmc	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number 1	Type of animal procedure Breeding with discomfort and phenotyping

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.

Primary goal

The primary goals of this appendix can be divided into two parts: to breed all needed genetically modified animals (mice and rats) for experiments and to [REDACTED] which is created.

Breeding

The aim of this procedure is to breed sufficient numbers of animals for the planned experiments (which are described in other appendices) and [REDACTED]. The breeding of animals with a chance of discomfort from their genetic modifications will be described here. The only animals with a chance of genotype-related discomfort are homozygous offspring of heterozygote - heterozygote crossings. The homozygous mutants will develop blindness within a few months.

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED] will be determined, including:

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

These screening methods will also be used for the experimental animals to test effectivity after intervention (other appendices).

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

Breeding

Animals will be group housed and mated according to well established experimental housing procedures for animal breeding. To achieve the best protection from possible contamination, the animals will be kept in a barrier environment such as individually ventilated cages (IVCs), fed sterilized chow food and only handled under a flow hood.

Phenotyping

SLO-OCT and ERG measurements will be both performed within the timeframe of one anaesthesia. These non-invasive techniques are used to follow the morphology and function of the retina over time within the same animal. We expect to measure each animal at least three times within the timeframe of one year. The animals will be in experiments for a time period of one year.

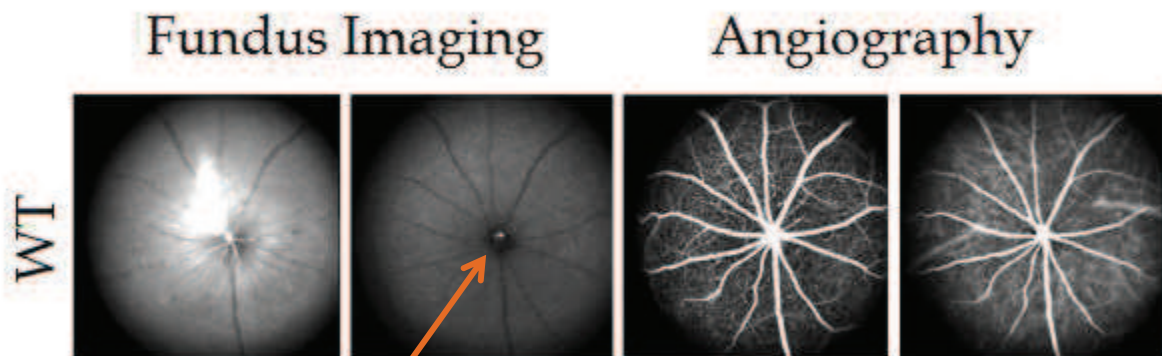


Figure 1 Using SLO one can visualize the morphology of the (inner) eye. This figure depicts examples of SLO images of a wildtype fundus (the image one sees when looking through the pupil in the eye using a SLO) (mouse). The optic nerve is present in the center of the eye and in the figure indicated by the arrow. The fundus of the rat is highly similar. The two images on the left depict the fundus using two different lasers. The two images on the right depict the blood vessels after visualization using a fluorescent dye (angiography). One uses this technique to find possible leakages.

SLO-OCT

The SLO module on our SLO-OCT combination is used to determine the general integrity of the retina. Large affected areas can be analysed with the use of this technique. In addition, the auto-fluorescence of the retina can be determined as well as the integrity of the blood vessels. To do this, different lasers are used (820 nm, 785 nm and 488 nm lasers). They shine through the pupil and illuminate the inside of the eye. The OCT module shows the morphology of the retina. All different layers can be distinguished and the thickness can be measured. Each measurement takes approximately 10 min (excluding (inhalation) anaesthesia).

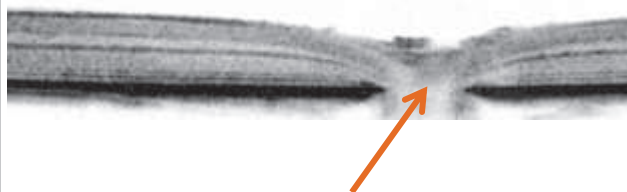


Figure 2 Example of OCT imaging of a WT retina (mouse). The optic nerve is indicated by the arrow. All the layers of the retina are visible when using this technique. The structure of the (WT) rat retina is highly similar.

ERG

By using non-invasive ERG measurements, the electric activity of the retina is determined. Once analysed, the data will show the activity of the rods (scotopic, a-wave, dark adapted animals), the cones (photopic, light adapted animals), the bipolar cells (scotopic, b-wave, dark adapted animals), the retinal pigment epithelium (RPE) and all other cell activities (oscillatory potentials) when stimulated with light. Each measurement takes approximately 25 minutes (excluding anaesthesia incubation). Two examples of ERG measurements in mice are presented in the figure below. Rat ERGs are highly similar.

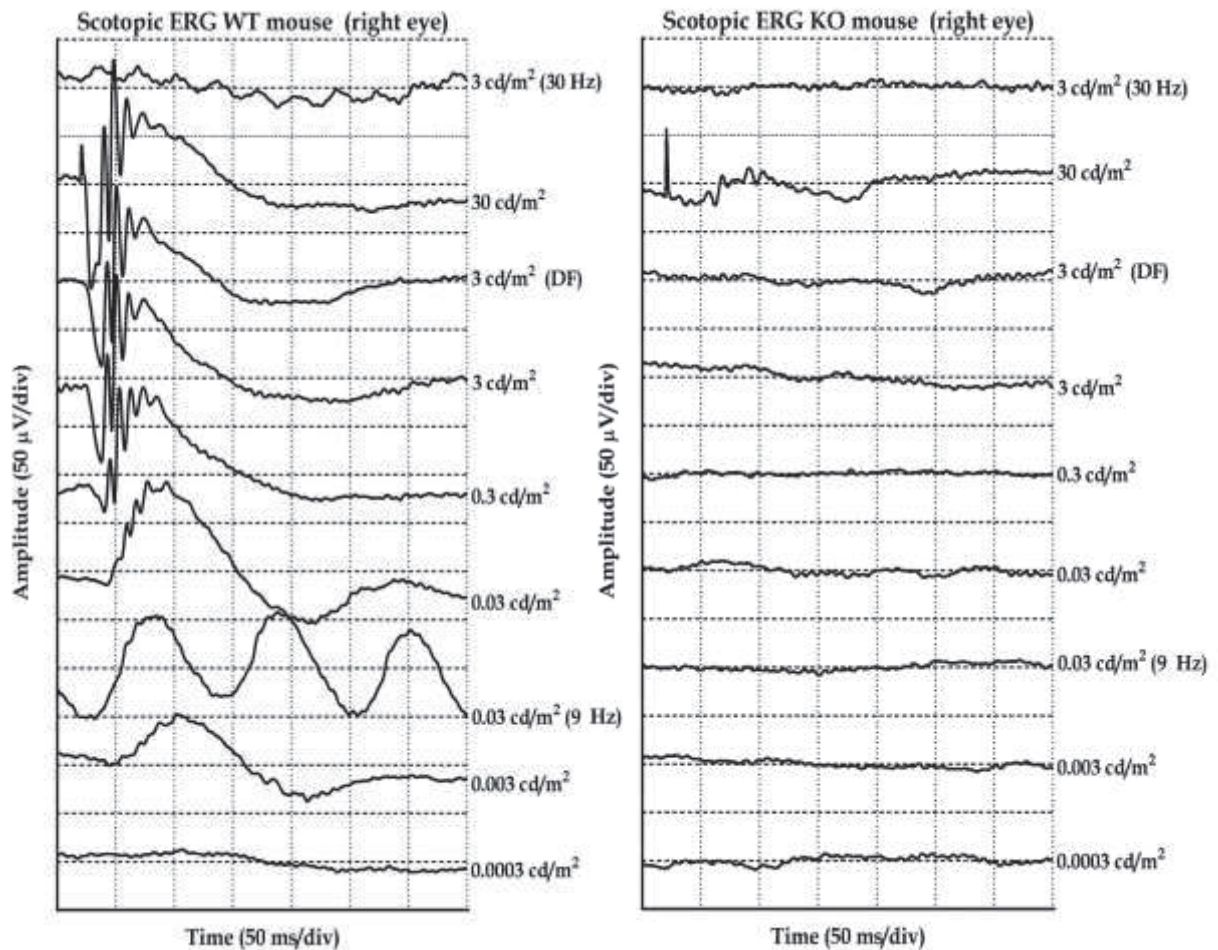


Figure 3 Examples of non-invasive ERG measurements performed on a WT mouse (left) and a ████████ knockout (KO) mouse (right). The activity of the retina (its electric signals) are recorded in an electroretinogram (ERG). The activity is measured upon a response to a flash of light. Within this measurement several light intensities are used, going from 0.0003 cd/m² (lowest) to 30 cd/m². Furthermore, a flicker light is used (9 Hz and 30 Hz) and a double flash (DF). It is clear from this figure that the WT mouse has a retinal response to light, while the ████████ KO mouse does not show any response. This makes sense since this KO mouse doesn't have an active visual cycle. A scotopic ERG measurement is performed in complete darkness, in this case only the rods are activated.

Pupillometry

The contraction of the pupil is a reflex as a result of exposure to light. This reflex is absent in animal models with a visual impairment. We will non-invasively measure the contraction of the pupil, with the use of infra-red video recordings, after exposure to light stimuli. This experiment is important to test the brain stem mediated feedback function and to see whether the signals are completely processed from the retina to the brain and back. Each measurement takes approximately 10 min.

Behavioral tests

We will also perform non-invasive behavioral tests which are based on vision. The behavior of the animals will be assessed using for example a light/dark room (see Figure 44). It is the nature of animals such as mice

and rats to hide from extensive light if they have the choice. In this experiment a cube is used which is half darkened. Animals which have normal vision will spend most of the time in the dark area, whereas animals which are blind will not notice the light and will therefore switch areas more and will be found more often in the bright area. The animal's movements will be recorded with video cameras and scored later. The importance of this experiment is to show whether the information from the retina to the visual cortex is correctly processed. Each test takes approximately 30 min. The tests can be performed under different light intensities in the bright compartment.

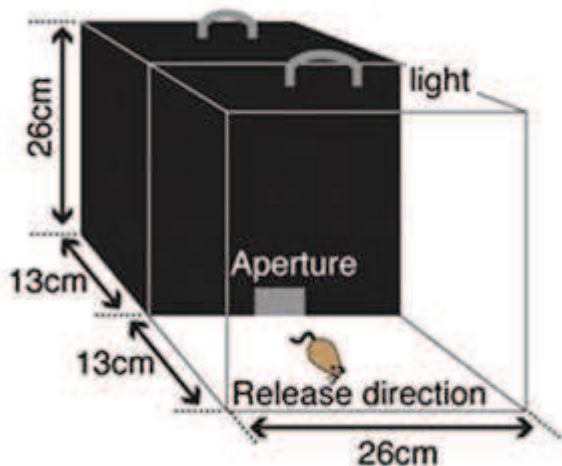


Figure 4 A light/dark chamber to test vision. These behavioral experiments are important to test whether information from retina is correctly processed to the visual cortex and other areas in the brain. Avoidance of the bright compartment will show us whether this is the case or not.

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

Breeding

The amount of animals which are kept in stock of the genetically modified lines, will be kept to the necessary minimum, i.e. usually one breeding trio per line and their most recent offspring. To ensure compatibility and prevent backcrossing, all animals will be maintained on a single genetic background [REDACTED] This will all be done by experienced personnel from the animal research centre.

Phenotyping

For the determination of the number of animals needed for [REDACTED] is according to literature and based on our previous experiences. In order to estimate the sufficient number of animals, we used the program G*power (<http://www.gpower.hhu.de/>), assuming a clear and consistent change (effect size = 0.8), a power of 0.8 and a significance level of 0.05. In addition, we will use the sample size calculator of the LASEC to determine sample size. Both methods will be combined. See the other appendices for the exact numbers of animals used in the specific experiments. [REDACTED]

[REDACTED]

See section B for the estimated numbers. The number of animals which need to be bred is based on the numbers described in appendix 3 (experimental animals).

A timeline of the experiments will be provided in all other appendices.

B. The animals

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

Breeding

Animals are (transgenic) [REDACTED] mice and rats. Both species need a [REDACTED], because the

Experiment	WT rat	█ rat	WT mouse	█ mouse
App. 1 phenotyping	32	32	-	-
App. 2	140	-	-	-
App. 3	112	840	112	168
App. 4	-	-	200	-
Total	284	872	312	168

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

Immortalized cell lines and primary cultures are well-suited to research into the basic and molecular effects, but they do not reflect complete *in vivo* systems (in our case; the eye).

For our █ it is essential to use animal models. One cannot re-create a functioning eye *in vitro* and follow its performance, especially not in the context of the whole animal. It is important to follow the effects over time in animal models to generate data about efficiency, efficacy and safety.

Reduction

For these experiments non-invasive screening and imaging techniques are used. This means that the animals which are used in the experiments can be followed and re-examined over time. It is therefore not necessary to use new animals for every time and measuring point. In addition, at the end of the experiments. Tissues will be isolated to answer any sub-goals and questions which are set on a molecular and biochemical level. We will match █, within each litter as much as possible, thus allowing us to have █ Both sexes can and will be used.

Refinement

Before the proposed experiments will be started, all investigators have practiced extensively to master all the techniques which are used. Hereby, mistakes are limited as are unsuccessful measurements.

The screening techniques (SLO, OCT and ERG) have been improved and optimized before starting the experiments. Human endpoint have been set and pain treatments will be applied when necessary. Besides the application of the anaesthesia, measurements are non-invasive (except for the intervention itself). There will be no pain. The animals will have environmental enrichment and will be housed socially (where possible).

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

During breeding, all animals will be kept in a strictly isolated environment to minimise chances of contamination. Animals will be monitored at least three times a week, and any animal showing signs of any extensive distress will be euthanized according to the humane endpoints.

All contributors of this project are trained specifically to perform all measurements and interventions to minimise complications and animal suffering, pain or fear. Injection anaesthesia will be used with perioperative analgesia which also has pain killing effects 6 hours after the treatment while animal recovery

period. To prevent infection, antibiotics will be applied and/or immune suppressors.

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.

This research is novel and has not yet been performed based on our knowledge of existing literature and in exchange with national and international experts in the field.

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 individual housing 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?

Breeding only 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 including perioperative pain relief when applicable is used, which is according to our experience enough to prevent any pain during and after procedures.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

The animals which are maintained under this protocol are those where moderate discomfort is expected in 25% of the mutant offspring of heterozygous - heterozygous breeding that will be homozygous mutants (but no pain!). They will develop (partial) blindness. Bodyweight and other read-outs for animal welfare will not change. One cannot tell which animal is blind, they behave normally.

Explain why these effects may emerge.

The genes which are mutated are essential for normal vision. Once mutated, cellular and molecular processes are disturbed and blindness will be developed.

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

Animals with [REDACTED] are blind, but since animals such as mice and rats are not dependent on their vision, they do not show any change in behaviour (under normal housing circumstances). In the very rare case that a humane endpoint is reached, animals will be terminated.

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.

Regulation and guidelines according to FELASA are applied.

Despite the best countermeasures, animal might sometimes show signs of undue distress. Outward signs such as a ruffled fur coat or wounds and behavioural signs such as limping, hunched back or immobility will be taken as a sign for undue distress and the animal will be sedated and euthanized immediately.

Indicate the likely incidence.

This is not likely <1%.

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').

Marking / tissue sampling for genotyping (mild, once): The animals will be marked by an appropriate method such as ear punching after the first postnatal week, which only causes momentary discomfort. The resulting samples will be used for genotyping. In rare instances, due to technical failures in genotyping a second sample may need to be taken.

Procedure	Discomfort level	%
(Partial) blindness as a result of a [REDACTED]	Moderate	100% [REDACTED]
Sacrificing	Mild	100% [REDACTED]
Anaesthesia for non-invasive screening	Moderate	100% [REDACTED]
Behavioural assay	Mild	100% [REDACTED]

The cumulative level of suffering will not exceed moderate in all animals.

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.

If the animals are not going to be used in other procedures, they will either be maintained in IVC for stock breeding ([REDACTED]) or are sacrificed (for tissue harvesting). After the experiments (see other appendices), the animals will be terminated to harvest their eyes and blood for further analyses.

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

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

Yes



Appendix Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11400				
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	VUmc				
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: left; width: 50%;">Serial number</td> <td style="text-align: left;">Type of animal procedure</td> </tr> <tr> <td style="text-align: left;">2</td> <td style="text-align: left;">[redacted] (setup of the method)</td> </tr> </table>	Serial number	Type of animal procedure	2	[redacted] (setup of the method)
Serial number	Type of animal procedure				
2	[redacted] (setup of the method)				

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.

Primary goal

The primary goal of these experiments is to develop the first steps for the generation of a new therapeutic intervention for patients with retinal degenerative diseases. For this, it is essential to test the efficacy and safety of the method. For this purpose, animal models (mice and rats) were specifically selected. The goal of the experiments described in this appendix is to set up [redacted] in our lab.

General design

This appendix covers the experiments in which rats are used to set up all handling procedures needed for the experiments in our lab. This is essential to train the persons involved in the experiments and to make the intervention as reproducible and effective as possible. [redacted]

Wildtype animals will be taken from stock breeding. All procedures will be carried out in the building complex of the animal facility.

Initially, animals will be used for the handlings and terminated afterwards (group 2.1). This to minimize animal suffering due to unexperienced contributors (technical staff and new employees).

Once all handlings are familiar, we will use animals that will wake up after transplantation procedures and

follow them for a few weeks to see whether the handlings themselves have adverse effects (group 2.2).

We will subsequently proceed on the next group of animals with [REDACTED]; group 2.3) to test preliminary effectivity.

Once we are convinced that the animals are not suffering more than necessary, we will proceed to the next appendix (experimental animals). Read-outs are SLO-OCT and ERG measurements (described in appendix 1), eye morphology (*in vivo* and immunohistochemistry) and animal welfare.

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

The experimental animals in this appendix are divided into three groups (2.1; Wildtype animals which are terminated, 2.2; Wildtype animals which will wake up and 2.3; Experimental [REDACTED])

Group 2.1: Animals will be anesthetized. Full anaesthesia will be confirmed by pinching the paw. All animals (also the other groups) will be kept warm during the entire procedure. Body temperature will be monitored during the whole procedure. The eyes of the animals will be anesthetized locally and dilated with eye drops. A [REDACTED]

[REDACTED] To maximize the use of each animal, both eyes will be used. The animals are not allowed to wake up again and will be terminated. Both sexes can and will be used. Animals are in the young-adolescent stage of their life.

Group 2.2: In case of scotopic (in the dark) ERG measurements, animals will be dark-adapted for at least 1 hour before the experiment and anesthetized. Full anaesthesia will be confirmed by pinching of the paw. The eyes of the animals will be locally anesthetized and dilated using eye drops. Scotopic and/or photopic (in the light) ERG measurements will be performed followed by SLO-OCT measurements (=baseline).

[REDACTED] One eye will serve as a control (will [REDACTED] and the other eye will [REDACTED]). The exact procedure is determined in group 2.1. After all procedures, correct [REDACTED] will be confirmed by using another SLO-OCT measurement. The animal is allowed to wake-up and antibiotic eye drops are applied. Follow-up ERG and SLO-OCT measurements will be performed after a few days (5-30) of recovery. Animals will be kept for a maximum of three months after the first procedure and no more than 5 measurements (4 follow-ups) will be performed per animal. Both sexes can and will be used. Animals are in the young-adolescent stage of their life.

Group 2.3: Before the procedures which are described for group 2.2 will be performed, the animals will be anesthetized. Full anaesthesia will be confirmed by pinching of the paw. The eyes of the animals will be anesthetized and dilated using eye drops. Scotopic and/or photopic ERG measurements will be performed followed by SLO-OCT measurements (=baseline). After this, the animals will receive an intra venous injection [REDACTED]. The optimal [REDACTED] needs to be determined first (these animals will not undergo the additional proceedings) using [REDACTED] (based on literature). After a few days (6-20), the animals will undergo the same procedures as did group 2.2. The animals will be followed for a maximum time period of three months. Both sexes can and will be used. Animals are in the young-adolescent stage of their life.



Justifications

As stated, the main goal of the experiments in this appendix is to develop (new) [redacted] techniques in our lab. We believe that we have enough background knowledge, manpower, experience and instruments to be successful. The non-invasive screening techniques ERG and SLO-OCT are useful to determine success of [redacted]. Especially for animals which will wake up after procedures, these techniques are nice because they leave no extra damage to the animal. General anaesthesia, combined with extensive use of local anaesthesia and where needed post-operative analgesics, ensure that the animals suffer as little discomfort as possible during [redacted]. In addition, the strict post-operative surveillance regime we have planned will safeguard against undetected discomfort due to recovery.

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

From the breeding stock, **both females and males** will be used, reducing breeding excess.

In order to estimate the animal numbers required for experiments we will use our previous knowledge and preliminary results from previous experiments where we also set up new methods.

For the determination of the number of animals needed [redacted] is according to literature and based on our previous experiences. In order to estimate the sufficient number of animals, we used the program G*power (<http://www.gpower.hhu.de/>), assuming a clear and consistent change (effect size = 0.8), a power of 0.8 and a significance level of 0.05. In addition, we will use the sample size calculator of the LASEC to determine sample size. Both methods will be combined.

B. The animals

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

All experiments will be performed with wildtype [redacted] of both sexes. The rats will be taken from general breeding stock (breeding without discomfort). The rat model is an ideal model organism for this type of research, because it is a mammal and therefore phylogenetically closely related to humans. In comparison to mouse models, rats have a bigger eyes and it is therefore better possible to [redacted]. Rats share large genetic similarity with humans, and their eye morphology is roughly similar. Nevertheless, we will try to set up the transplantation procedure also in mice (Appendix 4) for the simple reason that multiple transgenic mouse models are already available for retinal degenerative diseases. And since these diseases are heterogeneous, it is also important to test the intervention in different genetic backgrounds. Taken together, these factors mean that at this point of our

research, rats are the model of choice for our experiments.

Estimated numbers

Since the experiments, which will be performed with the animals in this appendix, are based on a desirable success rate, the estimation that we can make here is rough and based on our previous experience. We expect to need approximately 140 animals (groups 2.1+2.2+2.3) as described below. Both sexes will be used.

Group 2.1: Animals will be terminated after procedures.

We will continue experiments when the success rate of our procedure exceeds approximately 60%. This is based on the success rate of our [REDACTED]. %. This 60% success rate is set based on our previous experience. The procedure of [REDACTED]

[REDACTED] These are known reasons based on prior experience which account for the 40% failure rate. These animals cannot be included in the follow-up measurements. If we find that this is the case, a human endpoint has been reached and the animals will be terminated. We are preparing technical improvements to hopefully be able to decrease this failure rate (see below) but currently calculated the number of required animals based on the currently used method.

A successful [REDACTED] is performed when [REDACTED] [REDACTED] Little to no damage will be done to the hosting animal. [REDACTED] in which a cataract (touching of the lens, which blurs vision) or extensive intraocular bleedings are caused is not considered successful. To reach this we will use a maximum of 50 animals. This is estimated based on our previous experience in performing similar [REDACTED] in mice.

Group 2.2: Animals which are allowed to wake up after procedures and follow-up.

Once we are certain that we can perform [REDACTED] good enough to allow animals to wake up, we will follow at least 10 animals for a maximum time period of 1 month to determine any adverse effects caused by unexpected technical problems. Both eyes will be used for intervention within this group (either both [REDACTED]

Given the success rate of 60% and backup for non-statistically significant results, we will use a maximum of 30 animals. In total we will not exceed the total number of 30 animals within this (2.2) group.

Group 2.3: [REDACTED] to obtain preliminary data about effectiveness.

In this group wildtype animals will be used which, [REDACTED] [REDACTED] Within these animals one eye will serve as a control. Given a success rate of [REDACTED] of 60% [REDACTED] and minimal groups of n=6 per group we would estimate the following numbers:

$6 (n=6) \times 2 [REDACTED] \times 2 [REDACTED] = 24 (=60\%)$ so 40 animals.

In addition, within this group animals will also be used to determine the [REDACTED] [REDACTED] to use in rats. We previously did this in mice. We will use a [REDACTED] [REDACTED] in duplicate), after this we narrow it down [REDACTED] (in triplicate) to determine the [REDACTED]. Our estimation will be [REDACTED] = 19 animals.

In total we will not exceed the total number of 60 animals within this group (2.3).

Life stages

Animals will be used at the (young) adult stage. We chose to use adult animals for the simple fact that their eyes are grown the biggest possible. In addition, we will use genetically modified rats after the [REDACTED]

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

These experiments will only start once we have sufficient knowledge from *ex vivo* experiments. Immortalized cell lines and primary cultures are well-suited to research into the basic and molecular effects, but they do not form complete *in vivo* systems such as eyes. For these experiments it is essential to use animal models. One cannot re-create a functioning eye *in vitro* and follow its performance. It is important to follow the effects over time in animal models to generate data about efficiency, efficacy and safety.

Reduction

Before these experiments are started, all contributors have practiced extensively to master all the techniques which are used. Hereby, mistakes are limited as are unsuccessful measurements. For these experiments non-invasive screening and imaging techniques are used. This means that the animals which are used in the experiments can be followed over time. It is therefore not necessary to use new animals for every time and measuring point. In addition, at the end of the experiments. Tissues will be isolated to answer any sub-goals and questions which are set. We reduce variability in our experiments by using littermate controls wherever possible. This allows us to reach stronger effect sizes with smaller groups of animals due to lower variability. In addition, both males and females will be used, reducing excess of breeding. Technical refinements are in [REDACTED] to lower the percentage of drop-outs (see below).

Refinement

The screening techniques have been improved and optimized before starting the experiments. All testing which can be done *ex-vivo* will be done. Humane endpoints have been set and pain treatments will be applied when necessary. Besides the application of the anaesthesia, follow-up measurements are non-invasive. The animals will have environmental enrichment and will be housed socially (where possible). Technical refinements are in [REDACTED] thereby serving as refinement that may directly lead to reduction as mentioned above.

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

Animals will be monitored at three times a week, and any animal showing signs of excessive distress will be processed according to the humane endpoints. [REDACTED], the animals will be kept under anaesthesia, sufficiently deep to feel no pain (periodically assessed via paw pinching reflex), but sufficiently light to still breathe autonomously. [REDACTED] will be carried out in aseptic conditions with [REDACTED], in specialized surgery rooms of the animal facility. We will administer antibiotics at the end [REDACTED] (eye drops) and eye salve. If necessary, we will introduce the administration of general analgesic at the [REDACTED] to reduce pain during recovery. The analgesic (and/or antibiotics) will be re-administered if the animal shows any sign of distress in the weeks [REDACTED].

Repetition and duplication

E. Repetition

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

This research is novel and has not yet been performed based on our knowledge of existing literature and in exchange with national and international experts in the field.

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.

Gas or injection anaesthesia will be used as well as peri-operative analgesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

██████████: Although the eye is immune-privileged, there is a low risk of an inflammatory reaction at the ██████████. This will be closely monitored to ensure that the animal does not develop complications.

Explain why these effects may emerge.

██████████ The risk of inflammation is low. This risk will also be minimised by ██████████, thorough training of any researcher and staff involved, standard application of antibiotic eye drops and close monitoring of the animal ██████████

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

██████████ will be performed by experienced and thoroughly trained scientists and/or technicians. This is crucial to minimize the risks during the procedures. Furthermore, the animals will be closely monitored during and after all procedures to ensure that they do not suffer undue distress.

██████████ The animal will be kept warm (using a heating pad) ██████████ until coordinated movement is visible, then placed in its home cage and monitored until alert. If the animal shows signs of pain or distress from ██████████, it will be administered analgesics as needed. If any sign of an inflammatory reaction is seen, the animal will be given antibiotics and anti-inflammatory medication as needed. Following ██████████ the animals will be closely monitored. In all cases, if the animal shows bodily or behavioural symptoms indicating undue distress, it will be euthanized according to the humane endpoints outlined below.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Regulation and guidelines according to FELASA are applied. Despite the best countermeasures, animal might sometimes show signs of undue distress. Signs such as a ruffled fur coat or wounds and behavioural signs such as limping, hunched back or immobility will be taken as a sign for undue distress and the animal will be sedated and euthanized immediately. For ██████████, the animal will be monitored daily ██████████, and the ██████████, behaviour and level of activity will be watched. If the animal does show any signs of distress, it will be given analgesics and antibiotics. In case the animal does not show improvement within 48 hours after treatment, it will be euthanized. If animals cannot be used for follow-up measurements (40% drop-out), the animals will be euthanized. This will be, for example, when ██████████
██████████
██████████ Technical refinements are in ██████████ to lower this percentage in future experiments.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence is very low in the case of side-effects originating from ██████████. It is low for adverse ██████████ outcomes such as inflammation.

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').

Procedure	Discomfort level	
Administration of ██████████	Moderate	Group 2.3; 100%
Anaesthesia	Moderate	100%
██████████	Moderate	Group 2.2, 2.3; 100%
Follow-up measurements	Mild	100%

Administration of ██████████ (moderate, <1 minute, once): Group 2.3 will receive an i.v. injection containing ██████████ once.
 Anaesthesia application for procedures (moderate, <2 minutes, max. 6 times): The animal will be sedated with an appropriate sedative such as isoflurane or a mixture of ketamine/xylazine and the absence of pain reception will be tested via paw pinching (absence of a reflex indicates total absence of pain sensation).
 ██████████: mild, ██████████, recovery: moderate, ca. 1 week; once): The ██████████ will be done under anaesthesia, and pain will be reduced post-operation by application of analgesics as necessary. Yet, during the recovery period, ██████████ ██████████ will induce some moderate discomfort to the animal. Usually, the animals take a few days to recover, depending on the health status of the animal. After recovery, animals will generally not suffer further distress.
 Follow-up measurements: non-invasive measurements will be performed under anaesthesia (see above).

The cumulative discomfort will not exceed moderate for animals within this appendix.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be sacrificed at an appropriate time [REDACTED] for organ harvesting (usually eyes).
Tissue will be used for further *ex vivo* analyses.

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

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

X Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure |
|---------------|--|
| 3 | Experimental [REDACTED] in animal models for retinal degenerative diseases and its safety. |
- 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.

Primary goal

The primary goal of these experiments is to develop the first experimental steps for the generation of a new therapeutic intervention for patients with retinal degenerative diseases. For this, it is essential to test the safety and efficacy of the methods in animal models. The goal of the experiments described in this appendix is to use the previously (appendix 2 and 4) developed [REDACTED]

General design

This appendix covers the experiments in which rats (and mice, if the appendix 4 pilot experiment has succeeded) will undergo [REDACTED]

[REDACTED] Animals are divided into six groups.

Group 3.1: [REDACTED]

Group 3.2: [REDACTED]

Group 3.3: [REDACTED]

Group 3.4: [REDACTED]

Group 3.5: Safety in wildtype animals.

Group 3.6: [REDACTED]

The functional difference of [REDACTED] has not yet been shown. It is possible that there is a difference, or it is possible that there is no difference. It is essential to know this, before we can make a step towards a human clinical trial.

We will use animals with a [REDACTED] induced blindness, including [REDACTED]. In our studies we are aiming to be successful with our [REDACTED] in two rat models [REDACTED] and two mouse models [REDACTED].

Our aim here is to perform the [REDACTED] successfully in rats and mice. If we can show that we are able to generate similar results in the [REDACTED] we can conclude that the [REDACTED]. This would open a tremendous window of genetic models which are available in mice only. Please note here that we will only proceed with these mouse experiments once we have succeeded to perform sufficiently in rats as described in appendix 4.

Table 1 An overview of chemically and/or genetically induced blindness in animal models.

Genotype (rat/mouse)	Manipulation/age	RPE status	Phenotype
Wild type	None	Normal	Normal
Wild type	[REDACTED]	Structure loss	[REDACTED]
Wild type	[REDACTED]	Structure and function loss	[REDACTED]
[REDACTED]	Young adolescence	Function loss	[REDACTED]
[REDACTED]	Young adolescence	Function loss	[REDACTED]
[REDACTED]	Older	Function loss	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]	Structure and function loss	[REDACTED]

We will perform our previously setup [REDACTED] (appendix 2 and 4) only once we are convinced that we can perform very well. Read-outs are SLO-OCT and ERG measurements (described in appendix 1), behavioural experiments, eye morphology (*in vivo* and immunohistochemistry), expression profiling (after termination) and animal welfare.

We are aiming to answer the questions which we have set in the project proposal document.

Justification

The [REDACTED] is a previously used model in ophthalmology research. Our choice for rats over mice in the first experiments is a realistic one, since it has been shown that [REDACTED]

[REDACTED]

All animals will be followed for a maximum time period of a year. Within this window, we are convinced that any possible side-effects of the [REDACTED] will show. We expect also a functional recovery within this window.

The non-invasive techniques SLO, OCT and ERG will give as enough (functional) data to make any conclusions.

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

Wildtype animals and genetically modified animals will be taken from stock breeding (for breeding with discomfort, see appendix 1). All procedures will be carried out in the building complex of the animal facility. The experimental animals are divided into six groups. Animals will be used in (young) adulthood. Both sexes can and will be used.

Group 3.1: [REDACTED]

Within this group we will aim to use two models in rat and if possible two models in mouse. These will include [REDACTED] (group 3.1a) and [REDACTED] (group 3.1b).

Group 3.1b will undergo [REDACTED], group 3.1a will not.

Within this group we have several variables.

- Treated animals versus non-treated animals

[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]
[REDACTED]	[REDACTED]

Baseline ERG/SLO-OCT (and follow-up procedure)

In the case of scotopic ERG measurements, animals will be dark-adapted for at least 1 hour before the experiment. Injection and/or gas anaesthesia will be applied. Full anaesthesia will be confirmed by pinching of the paw. The eyes of the animals will be locally anesthetized and dilated using eye drops. Scotopic and/or photopic ERG measurements will be performed followed by SLO-OCT measurements. The animal will be kept warm during the whole procedure and body temperature will be monitored. In the case of an intervention, this will be performed within one anaesthesia. In the case of group 3.1b, animals will receive an intra venous injection with the [REDACTED] (appendix 2/4). The intervention will take place after a few days (5-20).

The intervention

Animals will be anesthetized and full anaesthesia will be confirmed by pinching the paw. All animals (also the other groups) will be kept warm during the entire procedure. Body temperature will be monitored during the whole procedure. The eyes of the animals will be anesthetized locally and dilated with eye drops.

[REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED] could be confirmed by using an additional SLO-OCT measurement. The animal is allowed to wake-up and antibiotic eye drops are applied. If found necessary, the animals will be administered with cyclosporine A or a comparable immune suppressor through their drinking water. Follow-up ERG and SLO-OCT measurements will be performed after a few days (6-20)

of recovery. Animals will be kept for a maximum of 1 year after the intervention. No more than 6 follow-up measurements will be performed.



Experimental group	Overall discomfort	Duration of experiment
Group 3.1, 3.2 and 3.4	Moderate	Maximally one year, no more than 6 follow-up measurements
Group 3.5	Moderate	Maximally one year, no more than 6 follow-up measurements
Group 3.6	Moderate	Maximally one year, no more than 6 follow-up measurements

Group 3.2, 3.3 and 3.4 have the same experimental setup as group 3.1. The only difference between the groups is [REDACTED]

Group 3.5 Safety in wildtype animals

As stated, this group of animals will be used to determine the safety of the procedure in wildtype animals. The animals will undergo the same procedures as the other groups (baseline SLO-OCT/ERG measurements, intervention and follow-up measurements) and will be followed over the course of a maximum of 1 year. We will screen the animals in particular for an [REDACTED], whether their vision is stable and whether or not [REDACTED].

Group 3.6 [REDACTED]

Within this group (experiments planned at the end of the project), we are aiming to apply [REDACTED]

The rationale behind this experiment is two-fold:

[REDACTED]

Second, we aim to use this procedure also for monogenic retinal degenerative diseases, that have a genetic causative component. [REDACTED]

[REDACTED]. Based on results in the previous experiments, we will aim to [REDACTED]

[REDACTED] For example; if we have cells from a [REDACTED]

██████████
We are aiming to be successfully apply this strategy in two animal models (rat **or** mouse, two genetic backgrounds). The exact genetic backgrounds are dependent on the patient cohorts which are available and on the previous experiments. In addition, depending on the outcomes of appendix (mouse pilot) and previous experiments, we will decide on whether to use mice or rats for these experiments. Last, we will decide ██████████ based on the previous experiments.

Genetic background 1 rat or mouse	Genetic background 2 rat or mouse
██████████	██████████
██████████	██████████

Justifications

As stated, the main goal of the experiments in this appendix is to set the first steps for the generation of a new therapeutic intervention for patients with retinal degenerative diseases. We believe that (once succeeded appendix 2 and 4) we have enough background knowledge, experience and instruments to be successful. The non-invasive screening techniques ERG and SLO-OCT are useful to determine success and generate *in vivo* data. These techniques will not leave extra damage to the animal. ██████████
██████████
██████████

General anaesthesia, combined with extensive use of local anaesthesia and where needed post-operative analgesics, ensure that the animals suffer as little discomfort as possible ██████████ and recovery. In addition, the strict ██████████ we have planned will safeguard against undetected discomfort due to recovery.

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

The amount of animals which are kept in stock of the genetically modified lines, will be kept to the necessary minimum, i.e. usually one breeding trio per line and their most recent offspring. To ensure compatibility and prevent backcrossing, all animals will be maintained on a single genetic background ██████████. To reduce breeding excess, both males and females will be used.

For the determination of the amount of animals needed for ██████████ is according to literature and based on our previous experiences. In order to estimate the sufficient number of animals, we used the program G*power (<http://www.gpower.hhu.de/>), assuming a clear and consistent change (effect size = 0.8), a power of 0.8 and a significance level of 0.05. In addition, we will use the sample size calculator of the LASEC to determine sample size. Both methods will be combined. See the other appendices for the exact numbers of animals used in the specific experiments.

B. The animals

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

All experiments will be performed with animals in a ██████████. The wildtype animals will be taken from general breeding stock (breeding without discomfort). The genetically altered animals will be taken from (our) general breeding stock (breeding with discomfort, see appendix 1). Mice and rats are ideal animal models for this type of research, since it is a mammal and therefore phylogenetically closely related to humans. Rats are relatively easy genetically modified in comparison to larger-eyed animals such as pigs and rabbits. In comparison to rats, mice are even more easy to genetically modify. However, in comparison to mice, rats have bigger eyes and are therefore a better possibility for the ██████████. If succeed in appendix 4 (mouse pilot) mice are also a possible animal model for ██████████. In this case, mice have our preference, since a lot of genetically altered mouse strains are already available or easily can be generated. Since the diseases which we study are mostly heterogenetic, it is important to test our intervention in different genetic backgrounds.

Taken together, these factors mean that at this point of our research, rats and possibly mice are the model of choice for our experiments.

Estimated numbers

At this point in time, we have succeeded setting up [REDACTED] in rats and possibly in mice. If not, we will not proceed to this appendix and use the animals which are assigned to the experimental groups in this appendix.

We have assigned animals within this appendix to different groups as stated also above:

Group 3.1: [REDACTED]

Group 3.2: [REDACTED]

Group 3.3: [REDACTED]

Group 3.4: [REDACTED]

Group 3.5: Safety in wildtype animals.

Group 3.6: [REDACTED].

Groups 3.1 t/m 3.4 can be generally summarized as follows:

Rats

2 models [REDACTED] x 4 conditions [REDACTED]
[REDACTED] x 2 [REDACTED] x 2 [REDACTED] = 2 x 2 x 4 x 2 x
2 = 56 "groups".

We expect to need 7 animals per group to reach statistical significance which means 56 x 7 = 392 animals.

Since we aim in the setup of [REDACTED]
of at least 60% and we expect an [REDACTED] drop-out of 10%, we expect to need (392 = 50%) a maximum
784 animals (rats) for the coming **five years**. This is however, the worst case scenario. We will only use the
necessary amount of animals.

This 60% success rate is set based on our previous experience. The procedure of [REDACTED]
[REDACTED]

[REDACTED] These are known reasons based on prior
experience which account for the 40% failure rate. These animals cannot be included in the follow-up
measurements. If we find that this is the case, a human endpoint has been reached and the animals will be
terminated. We are preparing technical improvements to hopefully be able to decrease this failure rate (see
below) but currently calculated the number of required animals based on the currently used method.

Mice

In the case that we proceed with mice at this point (**depending on the outcome of appendix 4**) we will test 2
models [REDACTED] x 4 conditions [REDACTED]
[REDACTED] x 1 [REDACTED] = 2 x 4 x 1 x 1 = 8 "groups".

We expect in the case of mouse to need 7 animals per group to reach statistical significance which means 8 x
7 = 56 animals. Since we aim in the setup of the transplantation procedure for a realistic success rate of at
least 60% and we expect a maximum drop-out [REDACTED] of 10%, we expect to need (56 = 50%) a
maximum of 112 animals (mice) for the coming **five years**. This is, however, the worst case scenario. We will
only use the necessary amount of animals.

Group 3.5: Safety in wildtype animals.

These experiments will be performed initially in rats, and if necessary also in mice.

We will test the safety of our procedure [REDACTED] in wildtype animals. This group can be
summarized as follows: 1 animal model x 4 conditions [REDACTED]
[REDACTED] x 1 [REDACTED] x 2 [REDACTED] = 1 x 4 x 1 x 2 = 8 "groups". We
expect to need 7 animals per group to reach statistical significance which means 8 x 7 = 56 animals. Since we
aim in the setup [REDACTED] for a realistic success rate of at least 60% and expect a
maximum drop-out [REDACTED] of 10%, we expect to need (56 = 50%) a maximum of 112 animals (rats
and/or mice). This is however, the worst case scenario. We will only use the necessary amount of animals.

Group 3.6 [REDACTED]

These experiments will be preferably performed in mice, since multiple genetically mutated strains are
already available and the new methodology can be applied to strains with other mutations. If we not

succeed in appendix 4, we will use rats in this group as an alternative.

This group can be summarized as follows: 2 genetic backgrounds x 2 conditions [redacted] = $2 \times 2 = 4$ "groups".

We expect to need 7 animals per group to reach statistical significance which means $4 \times 7 = 28$ animals (mice or rats). Since we aim in the setup of [redacted] for a realistic success rate of at least 60% and we expect a maximum drop-out [redacted] of 10%, we expect to need $(28 = 50\%)$ a maximum of 56 animals. This is, however, the worst case scenario. We will only use the necessary amount of animals.

To summarize the **maximum** amount of animals which will be used within this appendix (**within 5 years**):

Rats: $784 + 112 + \text{possibly } 56 =$ maximally 952 (from which 840 genetically modified and 112 wild-type).

Mice: **possibly** $112 + \text{possibly } 112 + \text{possibly } 56 =$ maximally 280 (from which 168 genetically modified and 112 wild-type).

Life stages

Animals will be used at the adolescent – adult stage. We will use genetically modified rats/mice. These animals are born [redacted] Both sexes can and will be used.

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

We have previously gained as much as possible knowledge from *ex vivo* experiments, including cell culture experiments and the usage of donor eyes (human). Immortalized cell lines and primary cultures are well-suited to research into the basic and molecular effects, but they do not form complete *in vivo* systems such as eyes. For these experiments it is essential to use animal models. One cannot re-create a functioning eye *in vitro* and follow its performance. It is important to follow the effects over time in animal models to generate data about efficiency, efficacy and safety.

Reduction

Before these experiments are started, all contributors have practiced extensively to master all the techniques which are used. Hereby, mistakes are limited as are unsuccessful measurements. In addition, at this point in time we have performed all procedures in appendices 2 (rats) and 4 (mice) and we are convinced that we can perform these very well.

For all experiments, non-invasive screening and imaging techniques are used. This means that the animals which are used in the experiments can be followed over time. It is therefore **not** necessary to use new animals for every time and measuring point. In addition, at the end of the experiments, the animals will not go to waste. Tissues will be isolated to answer any sub-goals and questions which are set.

We reduce variability in our experiments by using littermate controls wherever possible. This allows us to reach stronger effect sizes with smaller groups of animals due to lower variability. In addition, both males and females will be used, reducing excess of breeding. Technical refinements are in [redacted] to lower the percentage of drop-outs (see below).

Refinement

To guarantee the best possible environment and minimize chances of contamination for the animals during breeding, they will be housed in sterilized individually ventilated cages, receive sterilized food and drinking water, and only be handled under a flow hood.

The screening techniques [REDACTED] have been improved and optimized before starting the experiments. All testing which can be done ex-vivo has been done. Humane endpoints have been set and pain treatments will be applied when necessary. Besides the application of the anaesthesia, follow-up measurements are non-invasive. The animals will have environmental enrichment and will be housed socially (where possible). Technical refinements are [REDACTED] to lower the extend of damage and increase [REDACTED] thereby serving as refinement that may directly lead to reduction as mentioned above.

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

Animals will be monitored at least weekly, and any animal showing signs of excessive distress will be processed according to the humane endpoints. [REDACTED], the animals will be kept under anaesthesia, sufficiently deep to feel no pain (periodically assessed via paw pinching reflex), but sufficiently light to still breathe autonomously. [REDACTED] will be carried out in aseptic conditions with sterilized tools, in specialized facilities. We will administer antibiotics [REDACTED] (eye drops) and eye salve. If necessary, we will introduce the administration of general analgesic [REDACTED] to reduce pain during recovery. The analgesic (and/or antibiotics) will be re-administered if the animal shows any sign of distress in the weeks [REDACTED]

Repetition and duplication

E. Repetition

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

This research is novel and has not yet been performed based on our knowledge of existing literature and in exchange with national and intrnational experts in the field.

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

If animals cannot be used for follow-up measurements (40% drop-out), the animals will be euthanized. This will be, for example, [REDACTED]

[REDACTED] Technical refinements are in [REDACTED] to lower this percentage in future experiments.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence is very low in the case of side-effects originating from needle trauma. It is low for adverse post-surgery outcomes such as inflammation.

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').

Procedure	Discomfort level	
[REDACTED]	Moderate	Group 3.1 tm 3.4; 100%
Anaesthesia	Moderate	100%
[REDACTED]	Moderate	100%
Follow-up measurements	Mild	100%

Administration [REDACTED] (moderate, <1 minute, once): Group 2.3 will receive an i.v. injection containing [REDACTED]

Anaesthesia application for procedures (moderate, <2 minutes, max. 6 times): The animal will be sedated with an appropriate sedative such as isoflurane or a mixture of ketamine/xylazine and the absence of pain reception will be tested via paw pinching (absence of a reflex indicates total absence of pain sensation).

[REDACTED] recovery: moderate, ca 1 week; once): The [REDACTED] will be done under anaesthesia, and pain will be reduced [REDACTED] by application of analgesics as necessary. Yet, during the recovery period, [REDACTED] will induce some moderate discomfort to the animal. Usually, the animals take a few days to recover, depending on the health status of the animal. After recovery, animals will generally not suffer further distress.

Follow-up measurements: non-invasive measurements will be performed under anaesthesia (see above).

The animals will be in the experiments for the maximum period of a year.

The cumulative discomfort will not exceed moderate for animals within this appendix.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be sacrificed at an appropriate time after transplantation for organ harvesting (usually eyes). Tissue will be used for further *ex vivo* analyses.

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

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

X Yes



Appendix

Description animal procedures

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

1 General information

1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	11400				
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	VUmc				
1.3 List the serial number and type of animal procedure. <i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i>	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; text-align: center;">Serial number</td> <td style="width: 50%; text-align: center;">Type of animal procedure</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">4</td> <td>PILOT: [redacted] in mouse (setup the method)</td> </tr> </table>	Serial number	Type of animal procedure	4	PILOT: [redacted] in mouse (setup the method)
Serial number	Type of animal procedure				
4	PILOT: [redacted] in mouse (setup the method)				

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.

Primary goal

The primary goal of these experiments is to set the first steps for the generation of a new therapeutic intervention for patients with retinal degenerative diseases. For this, it is essential to test the efficacy and safety of the method in animal models. The goal of the pilot-experiments described in this appendix is to set-up [redacted] in our lab.

General design

This appendix covers the experiments in which mice are used to set-up all experimental procedures needed for the pilot-experiments. This pilot is essential to perform because the most ideal animal model for retinal degenerative diseases is an animal model for which multiple transgenic lines are available. This is reasoned from the fact that retinal degenerative diseases are mostly genetically heterogeneous. For different patient groups, a different model is required. Up to now, the mouse is the only animal model in which multiple transgenic lines exist or can be easily obtained. However, the mouse eye is relatively small [redacted]. We think that we can be successful in mice, but this requires a lot of experience (which we obtain during all rat experiments). Furthermore, it is essential to train the contributors which are involved in the experiments as good as possible. For this pilot, either [redacted]. Within this pilot, we clearly incorporated checkpoints at which we reason whether or not to continue with the experiments.

Initially, animals will be used for the experimental procedures and terminated afterwards (group 4.1). This is incorporated to minimize animal suffering due to the performance of new proceedings. The main goal after this first step is [REDACTED]

[REDACTED] a new technique, we have to perform a pilot experiment first. Please note here that we will only continue to the next step once we are fully convinced that the animal will not suffer more than it should after waking up from the procedure.

The next group of animals will therefore consist of animals which are allowed to wake up after the procedure (group 4.2). We will follow the animals for a few weeks to see whether the experimental procedures themselves have any adverse effects. Please note here that we will only continue to the next step once we are fully convinced of our abilities to apply an intervention to [REDACTED] animals. If we notice during or after the procedure that the animals suffer more than they should (see humane endpoints), we will terminate them preterm according to the described methods.

Group 4.3 consists of animals which are [REDACTED]. This group is used to test preliminary effectivity of the intervention. Once we are convinced that the animals are not suffering more than necessary, we will allow the mouse to be an animal model within our studies and we will then proceed (include the mouse) to the experimental animals (appendix 3).

Read-outs within this appendix are non-invasive SLO-OCT and ERG measurements (follow-up, described in appendix 1), eye morphology (*in vivo* and *ex vivo* immunohistochemistry) and animal welfare.

Justification

As stated before, the mouse is the most ideal animal model available when one focuses on the availability of several transgenic lines. We will perform this pilot because [REDACTED]. However, we think that this problem can be overcome. Especially once we have great experience using the same technology in rat eyes. Despite the size of the mouse eye, we are still aiming for availability [REDACTED]

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

Wildtype animals will be taken from stock breeding. All procedures will be carried out in the building complex of the animal facility (VU-UPC, Amsterdam).

The experimental animals within this pilot are divided into three groups (4.1; Wildtype animals termination, 4.2; wildtype animals which wake up and 4.3; [REDACTED]).

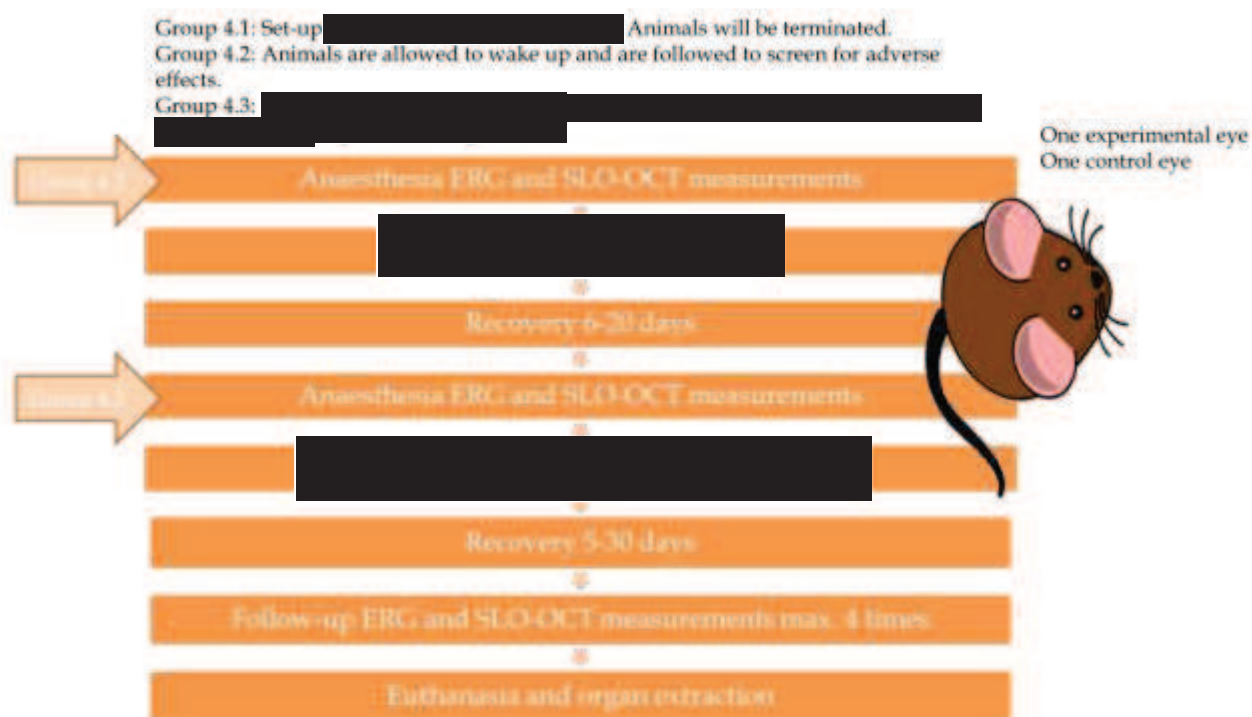
Group 4.1: Animals will be anesthetized and full anaesthesia will be confirmed by pinching of the paw. All animals (also the animals in the other groups) will be kept warm during the entire procedure. Body temperature will be monitored during the whole procedure. The eyes will be locally anesthetized and dilated with eye drops. Using [REDACTED]

[REDACTED] To maximize the use of each animal (and minimize total animal numbers), both eyes will be used. To minimize animal suffering, the animals are not allowed to wake up again and will be terminated immediately after the intervention. Only when we are convinced that we can perform all procedures very well, we will allow the animals to wake up after procedures (= checkpoint).

Group 4.2: Since we want to follow the (wildtype) animals from this group after the intervention, we will perform baseline measurements by SLO-OCT and ERG. In case of scotopic ERG measurements, animals will be dark-adapted for at least 1 hour before the experiment and anesthetized. Full anaesthesia will be

confirmed by pinching of the paw. The eyes of the animals will be locally anesthetized and dilated using eye drops. Scotopic and/or photopic ERG measurements will be performed followed by SLO-OCT measurements (= baseline). [redacted] according to the methods setup in group 4.1. Within this group (4.2), one eye will serve as a control (will [redacted] and the other eye will [redacted] [redacted] After all experimental procedures, [redacted] [redacted] The animal is allowed to wake up and antibiotic eye drops are applied. If necessary, the animals will be administered with cyclosporine A or a comparable immune suppressor through their drinking water. Follow-up ERG and SLO-OCT measurements will be performed after a few days (5-30) of recovery. Animals will be kept for a maximum of 1 month after the first procedure and no more than 5 measurements (4 follow-ups) will be performed per animal. Once we are convinced that within the monitoring period of 1 month the animals do not suffer more than necessary and we are successful [redacted] we will continue with the next group of animals.

Group 4.3: The animals within this group will be used to determine preliminary effectivity within a [redacted] [redacted] The animals will undergo the same procedures described for group 4.2. In addition to this, they will be anesthetized. Full anaesthesia will be confirmed by pinching of the paw. The eyes of the animals will be anaesthetized locally and dilated using eye drops. Scotopic (night vision) and/or photopic (day vision) ERG measurements will be performed followed by SLO-OCT measurements (=baseline). After this the animals will receive an intra venous injection [redacted] [redacted] After a recovery period (6-20 days) the animals will undergo the same procedures as the animals in group 4.2.



Justifications

As stated, the main goal of the experiments in this appendix is to get the (new) [redacted] up and running in our lab using the mouse as animal model. We believe that we have enough background knowledge, experience and instruments to have a chance to be successful. After and during this pilot, we clearly decide whether we will continue with the mouse as an animal model, since we are not sure whether we will succeed due to the size of the mouse eye. The non-invasive screening techniques ERG and SLO-OCT are useful to determine success of the technique. Especially for the animals which are allowed to wake up

after the procedures, these techniques are beneficial, because they leave no extra damage to the animal. General anaesthesia, combined with extensive use of local anaesthesia and where needed [REDACTED] analgesics, ensure that the animals suffer as little discomfort as possible [REDACTED] and recovery. In addition, the strict [REDACTED] surveillance regime that we have planned will safeguard against undetected discomfort during recovery due to the procedures.

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

From the breeding stock, both females and males will be used which reduces the excess of breeding. In order to estimate the animal numbers required for the pilot, we will consult our previous knowledge and experience from previous experiments. Within these experiments we also successfully set up new methods.

B. The animals

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

All experiments within this pilot will be performed with wildtype [REDACTED] mice. The mice will be taken from the general breeding stock (breeding without discomfort). The mouse model is an ideal animal model for this type of research, because it is a mammal and therefore phylogenetically closely related to humans. The mice is easily genetically modified in comparison to all other animal models. This holds the main advantage of this animal model, since retinal degenerative diseases are mostly genetically heterogeneous. Mice share large genetic similarity with humans and their eye morphology is roughly similar. Taken together, it would be a great benefit if we are able to perform [REDACTED] in mice.

Estimated numbers

Since the experiments, within this pilot, are based on a screening of possibilities and are based on a desirable success rate, the estimation that we can make here is rough and based on our previous experience. We expect to need approximately 200 animals as described below. We will not exceed this amount of animals within this pilot.

Group 4.1: Animals will be terminated after procedures. These animals will be used to screen for possible strategies to perform [REDACTED]. We will continue experiments when the success rate of the selected procedure(s) exceeds 60%. This 60% success rate is set based on our previous experience. The procedure of [REDACTED] [REDACTED] These are known reasons based on prior experience which account for the 40% failure rate. These animals cannot be included in the follow-up measurements. If we find that this is the case, a human endpoint has been reached and the animals will be terminated. We are preparing technical improvements to hopefully be able to decrease this failure rate (see below) but currently calculated the number of required animals based on the currently used method. To reach this, we will use a maximum of 100 animals.

Group 4.2: The animals are allowed to wake up after the procedure (if successfully performed) and will be followed over time. We will only allow the animals to wake up once we are certain that we are able to perform [REDACTED] sufficiently to limit animal suffering. We will follow at least 10 animals which received a [REDACTED] for a maximum time period of 1 month to determine any adverse effects due to technical problems. Both eyes will be used for intervention within this group [REDACTED] [REDACTED] Given the success rate of 60% and backup for non-statistically significant results, we will use a maximum of 50. In total we will not exceed the total number of 50 animals within this group. We will use as little animals as possible.

Group 4.3: The animals within this group are firstly [REDACTED] functioning. We will only continue using the animals within this group once we are convinced that within the time period of follow up there are no unnecessary adverse effects resulting from the intervention (determined using group 4.2). We will have two animal models within this group: [REDACTED] [REDACTED] Within these animals, one eye will serve as a control. Given a success rate of the [REDACTED] of 60% [REDACTED] and minimal group numbers of n=6, we would estimate the following numbers:

6 (animals per group) x 2 (models) x 2 [REDACTED] = 24 (=60%) so 40 animals.
We expect a drop-out percentage of 20% (based on our previous experience) during follow-up which makes a total number of 50 animals. We will use as little animals as possible.

Life stages

Animals will be used at the adult stage. We chose to use adult animals for the simple fact that their eyes are grown the biggest as possible. In addition, we plan to use genetically modified mice if we succeed setting up the [REDACTED]. These animals are born [REDACTED]
[REDACTED]

C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement

These experiments will only start once we have sufficient knowledge from *ex vivo* experiments and experience from previous experiments using the same animal model. Immortalized cell lines and primary cultures are well-suited to research into the basic and molecular effects, but they do not form complete *in vivo* systems such as eyes. For the experiments described here, it is essential to use animal models. One cannot re-create a functioning eye *in vitro* and follow its performance (yet). It is important to follow the effects over time in animal models to generate data about efficiency, efficacy and safety.

Reduction

For these experiments, non-invasive screening and imaging techniques are used. This means that the animals which are used in the experiments can be followed over time. It is therefore not necessary to use new animals for every time and measuring point. In addition, at the end of the experiments, the animals will not go to waste. Tissues will be isolated to answer any sub-goals and questions which are set. We reduce variability in our experiments by using littermate controls wherever possible. This allows us to reach stronger effect sizes with smaller groups of animals due to lower variability. In addition, both males and females will be used, reducing excess of breeding. By building in clear check-point between all steps of the experiment, we can decide whether we should proceed with the next group of animals. We will therefore not necessary use all animals which are described in this appendix. Technical refinements are [REDACTED]
[REDACTED] to lower the percentage of drop-outs (see below).

Refinement

Before the pilot will start, all contributors have been trained extensively to master all the techniques which are used. Hereby, mistakes are limited as are unsuccessful measurements.

All screening techniques have been improved and optimized before starting the experiments. All testing which can be done *ex vivo* will not require any animals. Humane endpoints have been set and pain treatments will be applied when necessary. Besides the application of anaesthesia, follow-up measurements are non-invasive. The animals will have environmental enrichment and will be housed socially (where possible). Technical refinements are [REDACTED]
[REDACTED] to lower the extend of damage and increase the [REDACTED] success thereby serving as refinement that may directly lead to reduction

as mentioned above.

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

Animals will be monitored at least weekly and any animal showing signs of excessive distress will be processed according to the humane endpoints. [REDACTED], the animals will be kept under anaesthesia, sufficiently deep to feel no pain (periodically assessed via paw pinching reflex), but sufficiently light to still breathe autonomously. [REDACTED] will be carried out in aseptic conditions with sterilized tools in specialized facilities. We will administer antibiotics at the [REDACTED] (eye drops) and eye salve. We will use [REDACTED] analgesia and if necessary the analgesics will be repeated during recovery. The analgesic (and/or antibiotics) will be re-administered if the animal shows any sign of distress in the weeks [REDACTED]

If we doubt the successfulness of a [REDACTED], we will not allow the animal to wake up under any circumstances.

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.

This research is novel and has not yet been performed based on our knowledge of existing literature and in exchange with national and international experts in the field.

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.

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

Gas or injection anaesthesia will be used as well as [REDACTED] analgesia.

I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

[REDACTED]: There is a low risk of an inflammatory reaction [REDACTED] in the eye. This will be closely monitored to ensure that the animal does not develop complications.

Explain why these effects may emerge.

[REDACTED]: Since [REDACTED]. The risk of inflammation is low. The risk will also be minimised by [REDACTED], thorough training of any researcher and staff involved, standard application of antibiotic eye drops and close monitoring of the animal [REDACTED]. When we are doubting the success [REDACTED] which results in a higher risk for animal suffering, we will not allow the animal to wake up.

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

[REDACTED] will be performed by experienced and thoroughly trained scientists and/or technicians. This is crucial to minimize the risks during the procedures. Furthermore, the animals will be closely monitored during and after all procedures to ensure that they do not suffer undue distress. [REDACTED] The animal will be kept warm (using a heating pad) [REDACTED] until coordinated movement is visible, then placed in its home cage and monitored until alert. If the animal shows signs of pain or distress from [REDACTED], it will be administered analgesics as needed. If any sign of an inflammatory reaction is seen, the animal will be given antibiotics and/or anti-inflammatory medication as needed. [REDACTED], the animals will be closely monitored. In all cases, if the animal shows bodily or behavioural symptoms indicating undue distress, it will be euthanized according to the humane endpoints outlined below.

J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

Regulation and guidelines according to FELASA are applied. Despite the best countermeasures, animal might sometimes show signs of undue distress. Outward signs such as a ruffled fur coat or wounds and behavioural signs such as limping, hunched back or immobility will be taken as a sign for undue distress and the animal will be sedated and euthanized immediately. [REDACTED], the animal will be monitored [REDACTED], and the state of [REDACTED], behaviour and level of activity will be watched. If the animal does show any signs of distress, it will be given analgesics and antibiotics. In case the animal does not show improvement within 48 hours after treatment, it will be euthanized.

If animals cannot be used for follow-up measurements (40% drop-out), the animals will be euthanized. This will be, for example, when [REDACTED]

[REDACTED] Technical refinements are in preparation [REDACTED] to lower this percentage in future experiments.

Indicate the likely incidence.

The likely incidence is very low in the case of side-effects originating from needle trauma. It is low for adverse [REDACTED] such as inflammation.

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').

Procedure	Discomfort level	
████████████████████	Moderate	Group 3.3: 100%
Anaesthesia	Moderate	100%
████████████████████	Moderate	Group 3.2 and 3.3: 100%
Follow-up measurements	Mild	Group 3.2 and 3.3: 100%

Administration ██████████ (moderate, <1 minute, once): Group 4.3 will receive an i.v. injection containing ██████████ once.

Anaesthesia application for procedures (moderate, <2 minutes, max. 6 times): The animal will be sedated with an appropriate sedative such as isoflurane or a mixture of ketamine/xylazine and the absence of pain reception will be tested via paw pinching (absence of a reflex indicates total absence of pain sensation).

████████████████████, recovery: moderate, ca 1 week; once): The ██████████ will be done under anaesthesia, and pain will be reduced post-operation by application of analgesics as necessary. Yet, during the recovery period, ██████████ will induce some moderate discomfort to the animal. Usually, the animals take a few days to recover, depending on the health status of the animal. After recovery, animals will generally not suffer further distress.

Follow-up measurements: non-invasive measurements will be performed under anaesthesia (see above). The cumulative discomfort will not exceed moderate for animals within this appendix.

End of experiment

L. Method of killing

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be sacrificed at an appropriate time ██████████ for organ harvesting (usually eyes). Tissue will be used for further *ex vivo* analyses.

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

A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer:
Het NVWA nummer is 11400
2. Titel van het project:
Experimental therapeutic transplantation of stem-cell derived retinal pigment epithelial cells in animal models for retinal degeneration
3. Titel van de NTS:
De experimentele therapeutische transplantatie van stamcel-retinaal pigment epitheel in diermodellen voor retinale degeneratie
4. Type aanvraag:
Nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
 - naam DEC: *Vrije Universiteit Amsterdam / VU medisch centrum*
 - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
 - e-mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
 - ontvangen door DEC: *02-05-2017*
 - aanvraag compleet: *02-05-2017*
 - in vergadering besproken: *09-05-2017*
 - anderszins behandeld: *n.v.t*
 - termijnonderbreking(en) van / tot: *10-05-2017 tot 16-05-2017 en 23-05-2017 tot 31-05-2017*
 - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen: *n.v.t.*
 - aanpassing aanvraag: *31-05-2017*
 - advies aan CCD: *06-06-2017*
7. Geef aan of de aanvraag is afgestemd met de IvD en deze de instemming heeft van de IvD.
 - Datum advies IvD: *02-05-2017*
 - Strekking advies IvD: *De IvD geeft aan dat de aanvrager het project met de IvD heeft afgestemd en dat deze de instemming heeft van de IvD.*
8. Eventueel horen van aanvrager: *n.v.t.*
9. Correspondentie met de aanvrager

Vraagronde 1

- Datum: *10-05-2017*
- Strekking gestelde vragen: *1. Bij de NTS ziet de DEC graag dat er meer uitleg komt over de handelingen met ongerief (3.4) en bij vermindering (4.2). 2. Bijlage 1 onderdeel k, alleen fokdieren waarbij ongerief kan optreden moeten worden vermeld. Bij doden, follow-up metingen en de*

gedragstest licht ongerief vermelden 3. Er moet meer uitleg komen bij de 60% succesrate, hoe ontstaat deze uitval van dieren?

- Datum antwoord: 16-05-2017

- Strekking antwoorden: 1. *Aangepast, de handelingen zijn afhankelijk van de groep waarin de experimentele dieren zich bevinden. Zo zijn er handelingen waar licht ongerief bij optreedt en handelingen waar matig ongerief bij optreedt. Vermindering: "We hebben voorafgaand aan dit onderzoek een grote investering gedaan in het opzetten van een non-invasieve screening faciliteit voor kleine proefdieren. Dit betekent dat we de dieren kunnen volgen over de tijd en dat we ze niet steeds per tijd/meetpunt hoeven op te offeren. Met deze technieken kunnen we de functionaliteit van het oog meten en de morfologie van het oog bekijken over de tijd. Zo kunnen we een ontwikkeling goed volgen binnen hetzelfde dier. Dit helpt om het aantal benodigde dieren sterk te verminderen"* 2. *Gedaan.* 3. *De uitval ontstaat* [REDACTED]

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

Vraagronde 2

- Datum: 23-05-2017

- Strekking gestelde vragen: 1. *Graag ziet de DEC nog dat men aangeeft dat door de moeilijkheid van* [REDACTED] *de kans bestaat dat de procedure niet werkt, noem de verschillende redenen.* 2. *De aantallen in de NTS en appendix 1 en 3 komen niet overeen, graag aanpassen.*

- Datum antwoord: 31-05-2017

- Strekking antwoorden: 1. *Aangepast "If animals cannot be used for follow-up measurements (40% drop-out), the animals will be euthanized. This will be, for example,* [REDACTED]

" 2. Dit is aangepast.

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

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

B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)

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

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).*

De DEC is van mening dat deze aanvraag een concrete doelstelling heeft en dat het een samenhangend geheel is, het kan getypeerd worden als een project. Het is helder welke handelingen individuele dieren zullen ondergaan. Hierdoor is ook duidelijk welk ongerief individuele dieren zullen ondergaan. De aanvrager heeft duidelijk de go/no go momenten beschreven. De DEC is er daardoor van overtuigd dat de aanvrager gedurende het project op zorgvuldige wijze besluiten zal nemen over de voortgang van het project en er niet onnodig dieren gebruikt zullen worden. Gezien het 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).: *n.v.t.*
3. *De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën fundamenteel en translationeel onderzoek zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling. De doelstelling is helder omschreven.*

Belangen en waarden

4. 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.

Het netvlies (ofwel de retina) is een zenuwlaagje dat de binnenkant van het oog bekleed. Het bestaat uit miljoenen zintuigcellen die het licht opvangen dat het oog binnenkomt. Bij retinale degeneratieve ziektes, zoals Retinitis Pigmentosa (RP) of leeftijd gerelateerde macula degeneratie (AMD), ontstaan zwakke plekken in de retina waardoor het zicht sterk vermindert. Op dit moment bestaan er geen effectieve behandelingen voor AMD en RP, en wanneer het zicht verloren is zijn er geen behandelingsmogelijkheden meer. Daarom is er een sterke behoefte aan nieuwe therapeutische mogelijkheden.

Het directe doel van deze studie is onderzoek doen naar [REDACTED]

[REDACTED] om te kijken of men hiermee de functie van de retina kan herstellen. Het uiteindelijke doel is het ontwikkelen van een nieuwe therapie om verschillende retinale degeneratieve ziektes te kunnen behandelen. Er is een reële relatie tussen deze beide doelstellingen. Het directe doel is nodig om het uiteindelijke doel te bereiken.

5. Benoem de belanghebbenden in het project en beschrijf voor elk van de belanghebbenden welke morele waarden in het geding zijn of bevorderd worden (Zie Praktische handreiking ETK: Stap 2.B en tabel 1; zie bijlage I voor voorbeeld)

De belangrijkste belanghebbenden in dit project zijn: de proefdieren, de onderzoekers en de patiënten leidend aan retinale degeneratieve ziektes.

De waarden die voor proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren handelingen ondergaan en worden gedood. De waarde van deze proef voor onderzoekers is: Het vergroten van de wetenschappelijke kennis. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: De studie draagt naar verwachting bij aan het ontwikkelen van een betere behandeling van patiënten met retinale degeneratie.

6. Is er aanleiding voor de DEC om de in de aanvraag beschreven effecten op het milieu in twijfel te trekken?: *n.v.t*

Proefopzet en haalbaarheid

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

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

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

De aanvraag heeft een navolgbare opbouw en is naar de mening van de DEC goed opgezet. De voorgestelde experimentele opzet en uitkomstparameters zijn logisch en helder en sluiten aan bij de aangegeven doelstellingen. De DEC acht het reëel om te veronderstellen dat op basis van de resultaten van de voorgenomen reeks experimenten beschreven in het project, nieuwe en/of aanvullende kennis over retinale degeneratieve ziektes zal worden verkregen. De gevraagde looptijd van 5 jaar acht de DEC reëel gezien de opbouw en de financiële ondersteuning.

Welzijn dieren

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

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

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.

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

11. Beoordeel of het cumulatieve ongerief als gevolg van de dierproeven voor elk dier realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Licht uw beoordeling toe.

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

Het ongerief is matig bij 100% van de dieren. De dieren ondervinden licht ongerief als gevolg van de follow-up metingen, de gedragstest en het doden. De dieren zullen matig ongerief ondervinden als gevolg van de non-invasieve screening onder anesthesie, [REDACTED]

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.

In het project wordt optimaal tegemoetgekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven.

Door gebruik te maken van het gefaseerd uitvoeren van de experimenten en een poweranalyse wordt voorkomen dat er teveel (of te weinig) dieren worden gebruikt. Dankzij het opzetten van een non-invasieve screening faciliteit voor kleine proefdieren kunnen de onderzoekers de experimentele dieren volgen over de tijd en hoeft men niet per tijd/meetpunt dieren te offeren. Dit helpt om het aantal benodigde dieren sterk te verminderen.

Het maximale aantal proefdieren is proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De DEC onderschrijft dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 1156 ratten en 480 muizen en acht dit aantal realistisch onderbouwd. Onnodige duplicatie van experimenten wordt voorkomen doordat de onderzoekers goed bekend zijn met het onderzoeksveld en samenwerken met de andere onderzoeksgroepen die vergelijkbaar onderzoek verrichten.

16. 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.

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

Om stress en ongerief te reduceren worden de dieren (zoveel mogelijk) sociaal gehuisvest, en worden de dieren verzorgd en gecontroleerd door bevoegd en bekwaam personeel. Door het gebruik van non-invasieve screening technieken zijn er relatief weinig handelingen die pijn en ongerief veroorzaken. Daarnaast worden adequate anesthesie en pijnstilling gebruikt om het ongerief van de ingrepen tot een minimum te beperken. Bovendien wordt er preventief antibiotica (oogdruppels) toegediend om ooginfecties na behandeling te voorkomen. Voordat ernstig ongerief optreedt, worden de humane eindpunten toegepast.

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

Dieren in voorraad gedood en bestemming dieren na afloop proef

18. Geef aan of dieren van beide geslachten in gelijke mate ingezet zullen worden. Indien alleen dieren van één geslacht gebruikt worden, beoordeel of de aanvrager dat in voldoende mate wetenschappelijk heeft onderbouwd.

Dieren van beide geslachten zullen in gelijke mate worden gebruikt.

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.

Na het doden van de dieren zal men de ogen, het bloed en weefsel verzamelen voor verdere analyse. Er wordt een dodingsmethode uit bijlage IV van richtlijn 2010/63/EU gebruikt.

20. Indien niet-humane primaten, honden, katten of landbouwhuisdieren worden gedood om niet-wetenschappelijke redenen, is herplaatsing of hergebruik overwogen? Licht toe waarom dit wel/niet mogelijk is: *n.v.t.*

NTS

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

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

D. Ethische afweging

1. Benoem de centrale morele vraag

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

Bij deze dierproef is de centrale morele vraag: Rechtvaardigt het ontwikkelen van een nieuwe therapie voor de behandeling van retinale degeneratieve ziektes het gebruik van maximaal 1156 ratten en 480 muizen in de dierproef, die daarvan maximaal matig ongerief ondervinden?

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

De waarden die voor de proefdieren in het geding zijn: De integriteit van de dieren zal worden aangetast omdat de dieren ██████████ en handelingen ondergaan en worden gedood. Tijdens de experimenten ondervinden alle dieren matig ongerief. Dit leidt tot veel nadeel voor deze proefdieren. De waarden voor de onderzoekers: voordeel vanwege de kennisontwikkeling. Waarden die voor patiënten bevorderd worden: veel voordeel wanneer het onderzoek zorgt voor de ontwikkeling van een nieuwe therapie voor patiënten met een retinale degeneratieve ziekte.

De DEC is van mening dat de kennisontwikkeling en lange termijn belangen van de patiënten in dit project zwaarder wegen dan de belangen van de 1156 ratten en 480 muizen die hiervoor als proefdieren gebruikt worden. Er zijn op dit moment geen alternatieven voor deze dierproeven beschikbaar waarmee men de doelstellingen kan bereiken.

3. Beantwoord de centrale morele vraag. Maak voor het beantwoorden van deze vraag gebruik van bovenstaande afweging van morele waarden.

Volgens de DEC rechtvaardigen de doeleinden van dit project het voorgestelde gebruik van dieren. Het directe doel van deze studie is onderzoek doen naar het gebruik ██████████ voor de behandeling van retinale degeneratie. Het verwachte resultaat, in het kader van het beschikbaar komen van een nieuwe therapie voor patiënten met een retinale degeneratieve ziekte is afgewogen tegen het, als matig geschatte ongerief en het doden van de dieren in de proef.

De DEC onderschrijft dat de doelstellingen niet zonder het gebruik van proefdieren kunnen worden behaald en acht het gebruik van maximaal maximaal 1156 ratten en 480 muizen en de daarmee samenhangende schade aan deze dieren gerechtvaardigd. Bij het uitvoeren van de dierproeven wordt een adequate invulling gegeven aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en verfijning van de dierproeven. Het project is (1) van substantieel belang en (2) van goede kwaliteit.

(1) Er is sprake van een substantieel maatschappelijk en wetenschappelijk belang. De resultaten van dit onderzoek zullen bijdragen aan de kennis over en de ontwikkeling van een behandeltherapie voor retinale degeneratieve ziektes.

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

Samenvattend kan worden gesteld dat het als substantieel te kwalificeren maatschappelijk belang en wetenschappelijk belang van het onderzoek naar het oordeel van de DEC opweegt tegen het gebruik van maximaal 1156 ratten en 480 muizen en het daarbij verwachte matige ongerief.

E. Advies

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

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

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

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

Er is geen dilemma geconstateerd.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum te 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
AVD1140020172044
Bijlagen
2

Datum 8 juni 2017

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 7 juni 2017. Het gaat om uw project "Experimental therapeutic transplantation of stem-cell derived retinal pigment epithelial cells in animal models for retinal degeneration". Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD1140020172044. Gebruik dit nummer wanneer u contact met de CCD opneemt.

Wacht met de uitvoering van uw project

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

Factuur

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

Meer informatie

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

Datum:

8 juni 2017

Aanvraagnummer:

AVD1140020172044

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven

Deze brief is automatisch aangemaakt en daarom niet ondertekend.

Bijlagen:

- Gegevens aanvraagformulier
- Factuur






Datum:
8 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020172044

Gegevens aanvrager

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 11400
Naam instelling of organisatie: Vrije Universiteit Medisch Centrum te Amsterdam
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: 
KvK-nummer: 64156338
Straat en huisnummer: De Boelelaan 1117
Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM
IBAN: NL69RAVO1025169891
Tenaamstelling van het rekeningnummer: VUMC

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Datum:
8 juni 2017
Aanvraagnummer:
AVD1140020172044

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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



Gegevens gemachtigde

Naam:
Adres:
Postcode en plaats:
Wilt u een nieuwe machtiging afgeven?



Wat mag de gemachtigde doen?

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

Over uw aanvraag

Wat voor aanvraag doet u?

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag



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

Onze referentie
Aanvraagnummer
AVD1140020172044
Bijlagen
2

Datum 8 juni 2017
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

Factuur

Factuurdatum: 8 juni 2017
Vervaldatum: 8 juli 2017
Factuurnummer: 172044

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD1140020172044	€ 1.684,00

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



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Vrije Universiteit Medisch Centrum te Amsterdam

[Redacted address information]

**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
AVD1140020172044
Bijlagen
1

Datum 17 juli 2017
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 7 juni 2017 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Experimental therapeutic transplantation of stem-cell derived retinal pigment epithelial cells in animal models for retinal degeneration" met aanvraagnummer AVD1140020172044. 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 "Experimental therapeutic transplantation of stem-cell derived retinal pigment epithelial cells in animal models for retinal degeneration" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 oktober 2017 tot en met 30 september 2022.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

Procedure

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum gevoegd. Dit advies is opgesteld op 6 juni 2017. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

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

aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

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

Datum:

17 juli 2017

Aanvraagnummer:

AVD1140020172044

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

Algemeen Secretaris

Bijlagen:

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



Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Vrije Universiteit Medisch Centrum te Amsterdam

Adres: De Boelelaan 1117

Postcode en plaats: 1081 HV AMSTERDAM

Deelnemersnummer: 11400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 oktober 2017 tot en met 30 september 2022, voor het project "Experimental therapeutic transplantation of stem-cell derived retinal pigment epithelial cells in animal models for retinal degeneration" met aanvraagnummer AVD1140020172044, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Vrije Universiteit / VU Medisch Centrum. Er worden aanvullende algemene voorwaarde(n) gesteld.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

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

Aanvraagnummer:
AVD1140020172044

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
3.4.4.1. Breeding with discomfort and phenotyping				
	Ratten [REDACTED] /	64	100% Matig	
3.4.4.2 [REDACTED] [REDACTED] in rat (setup of the method)				
	Ratten [REDACTED] /	140	100% Matig	
3.4.4.3 Experimental transplantation (suspension and scaffold) of stem cell-RPE cells in animal models for retinal degenerative diseases and its safety.				
	Ratten [REDACTED] /	952	100% Matig	
	Muizen (Mus musculus) /	280	100% Matig	
3.4.4.4 PILOT: Transplantation [REDACTED] [REDACTED] in mouse (setup the method)				
	Muizen (Mus musculus) /	200	100% Matig	

Voorwaarden

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

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

Aanvraagnummer:

AVD1140020172044

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:

AVD1140020172044

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:

AVD1140020172044

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.