



## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

### Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
centralecommissiedierproeven.nl

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)

wob-ccd@rvo.nl

### Onze referentie

B.2.16.024  
B.2.16.025

### Uw referentie

**Briefkenmerk**  
CCD-2017-125

**Bijlage**  
2

Datum

04 MEI 2017

Betreft Beslissing op bezwaar B.2.16.024/B.2.16.025 (W16-07S)

Geachte [REDACTED]

Bij brief van 15 september 2016, ontvangen op 16 september 2016, heeft de gemachtigde van vergunninghouder verbonden aan NTS 2016385 een bezwaarschrift (kenmerk /1032841-18203471) ingediend tegen het besluit van de Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) van 31 augustus 2016 met kenmerk W16-07S.

Bij brief van 4 oktober 2016, ontvangen op 5 oktober 2016, heeft gemachtigde van Wob-verzoeker namens zijn cliënte een bezwaarschrift (kenmerk 2016/152) ingediend tegen het besluit van de CCD van 31 augustus 2016 met kenmerk W16-07S.

### Beslissing

Het bestuur van de CCD verklaart het bezwaar van gemachtigde van Wob-verzoeker gedeeltelijk gegrond. Het bezwaar van vergunninghouder verbonden aan NTS 2016385 wordt eveneens gedeeltelijk gegrond verklaard. Het bezwaarschrift van gemachtigde van Wob-verzoeker heeft aanleiding gegeven meer stukken openbaar te maken.

Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen de CCD tot deze beslissing is gekomen.

### Opschorting en verdaging

Bij brief van 13 oktober 2016 hebben wij de ontvangst van uw bezwaarschriften bevestigd. Op 21 november 2016 is vervolgens de beslistermijn aan u beide verdaagd en/of opgeschort. In deze brief hebben wij opgenomen in welke situaties de beslistermijn kan worden verlengd.

In het bezwaarschrift van gemachtigde van Wob-verzoeker is gesteld dat het niet mogelijk is "een, op documenten toegesneden bezwaar te formuleren." Wij informeerden u beiden bij onze brief van 19 oktober 2016 dat de bij het Wob-verzoek gevraagde documenten binnen een aantal dagen op onze website geplaatst worden. Op 24 oktober 2016 hebben wij de gevraagde documenten op onze website geplaatst. De stukken verbonden aan NTS 2016385 zijn hiervan, in verband met een ingediende voorlopige voorziening, uitgezonderd.

Wij hebben van gemachtigde van Wob-verzoeker geen aanvullende bezwaar gronden ontvangen. Bij e-mail van 16 maart 2017 hebben wij hem hiervoor tot en met 30 maart 2017 gelegenheid gegeven. Gemachtigde van Wob-verzoeker heeft hiervan geen, althans niet tijdig, gebruik gemaakt.

#### **Verloop van de procedure**

Op 17 en 18 maart 2016 is per meerdere e-mails, op grond van de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: de Wob), verzocht om toezending van documenten die betrekking hebben op negen verschillende vergunningaanvragen. Voor een opsomming van de vergunningen wordt verwezen naar het verzoek en het bestreden besluit.

Bij besluit van 31 augustus 2016 is beslist op het Wob-verzoek.

Het bezwaarschrift van vergunninghouder met NTS 2016385 is op 15 september 2016 per brief ingediend. Bij brief van 4 oktober 2016 heeft gemachtigde van Wob-verzoeker een bezwaarschrift ingediend.

Op 4 april 2017 heeft een hoorzitting plaatsgevonden waarvoor gemachtigde van Wob-verzoeker is uitgenodigd voor het geven van een toelichting op ingenomen standpunten. Gemachtigde van vergunninghouder is op 30 maart 2017 telefonisch gehoord. Op verzoek van gemachtigde van vergunninghouder is mede vanwege het bespreken van vertrouwelijke bedrijfsgegevens afzonderlijk gehoord. Partijen zijn geïnformeerd over het verhandelde tijdens het horen buiten hun aanwezigheid. Voor de verslagen van de hoorzittingen wordt verwezen naar de bijlagen. Derde belanghebbenden hebben geen gebruik gemaakt van hun gelegenheid gehoord te worden.

Op 16 maart 2017 is gemachtigde van Wob-verzoeker nogmaals geïnformeerd dat de stukken vanaf eind 2016 gepubliceerd zijn op de site van de CCD en dat hij of zijn cliënte hierover destijds is geïnformeerd. In het bezwaarschrift van gemachtigde is gesteld dat hij in verband met het ontbreken van de opgevraagde documenten geen volledige bezwaargronden kon aanvoeren. Bovenstaande berichten hebben echter niet geleid tot aanvullende bezwaargronden. Per email van 16 maart 2017 is hem aangegeven dat hij indien hij zijn bezwaar wenst aan te vullen, dat kan tot en met 30 maart 2017. Ruim voor deze datum zijn de geanonimiseerde zienswijzen en het voornoemde bezwaarschrift van gemachtigde van vergunninghouder verstrekt. Vast staat dat voor afloop van deze termijn geen aanvullende gronden zijn ontvangen.

Tijdens de hoorzitting heeft gemachtigde van Wob-verzoeker een aanzienlijk aantal nieuwe en op specifieke documenten toegespitste bezwaargronden aangevoerd. Gesteld wordt dat met het zodanig laat kenbaar maken van nieuwe argumenten derde belanghebbenden worden belemmerd om daarop adequaat te reageren en de goede voortgang van de procedure daardoor is belemmerd. De



handelswijze van gemachtigde wekt bovendien op zijn minst de indruk dat deze bedoeld is om de besluitvorming te vertragen, zodat deze een dwangsom verbeurt. De gemachtigde is immers in verband met een ingediend beroep niet tijdig beslissen rechtstreeks gebaat bij het verbeuren van de dwangsommen.

#### **Ten aanzien van de ontvankelijkheid**

De bezwaren richten zich tegen het besluit van 31 augustus 2016. De bezwaarschriften zijn ingediend binnen zes weken na bekendmaking van het besluit. De bezwaren zijn derhalve tijdig ingediend. Voldaan is ook aan de overige door de Algemene wet bestuursrecht (hierna: Awb) gestelde eisen, zodat de bezwaarschriften ontvankelijk zijn.

#### **Derde belanghebbenden**

De derde belanghebbenden zijn gevraagd om een zienswijze. Bij de behandeling van de bezwaren zijn derde belanghebbenden nogmaals in de gelegenheid gesteld aanvulling te geven op de eerder ingediende zienswijze en te reageren op de bezwaargronden van gemachtigde van Wob-verzoeker. Deze zienswijzen zijn aan gemachtigde van Wob-verzoeker voor de hoorzitting anoniem, verbonden aan een uniek NTS nummer, verstrekt.

#### **Bezwaren**

Hieronder worden de bezwaargronden van zowel de vergunninghouder als de gemachtigde van Wob-verzoeker kort toegelicht.

##### *Vergunninghouder (bij NTS2016385)*

In het besluit wordt meer informatie verstrekt dan bezwaarde wenselijk acht. De informatie zoals aangegeven in de zienswijzen zouden volgens bezwaarde niet verstrekt mogen worden vanwege het bedrijfsvertrouwelijke karakter ervan (hierna: **bezwaar 1**). In document 5 is ten onrechte een persoonsnaam niet zwart gemaakt (hierna: **bezwaar 2**). Tevens wordt aangevoerd dat de instellinggegevens niet openbaar gemaakt mogen worden vanwege de vrees voor dierenrechtenextremisme en tot op heden er nergens verband te leggen is tussen de vergunning (proeven) en de instelling (hierna: **bezwaar 3**).

##### *Gemachtigde van Wob-verzoeker*

De bezwaren van gemachtigde van Wob-verzoeker zien toe op meerdere punten. Allereerst is aangegeven dat de data van vergaderingen van de CCD niet kunnen worden geweigerd op grond van artikel 11 lid 1 van de Wob (hierna: **bezwaar 1**). Voorts maakt u bezwaar tegen het niet kenbaar maken van de weigerings- of uitzonderingsgronden per specifieke passage (hierna: **bezwaar 2**).

Daarnaast heeft u aangegeven dat weigeringen op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob – anders dan namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen – niet inzichtelijk zijn gemaakt. De zienswijzen van derde belanghebbenden worden genoemd, maar het oordeel van de CCD hierover ontbreekt (hierna: **bezwaar 3**). Tevens maakt u bezwaar tegen het feit dat informatie wordt geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub e van de Wob en dat dit wordt gemotiveerd door te verwijzen naar dierenrechtenactivisme (hierna: **bezwaar 4**). Gedurende de bezwarenhoorzitting heeft u voor het eerst de volgende bezwaren aangedragen. De weigeringsgronden onevenredige benadeling en bedrijfs- en fabricagegegevens zijn niet goed toegepast (hierna: **bezwaar 5**). Meerdere literatuurverwijzingen (referenties) zijn ten onrechte gelakt (hierna: **bezwaar 6**).

## **Bezwaren van Vergunninghouder (bij NTS2016385)**

### **Ten aanzien van bezwaar 1**

Deze bezwaargrond slaagt.

Tijdens de hoorzitting zijn de verschillende volgens vergunninghouder te weigeren passages in de documenten doorgenomen. Dit heeft geleid tot meer openbaarmakingen dan vergunninghouder in haar bezwaar heeft onderbouwd. Ten aanzien van de geweigerde delen van de onderzoeksopzet wordt aanvullend aan de overwegingen in het primaire besluit gesteld dat de te weigeren informatie inzicht geeft in de onderzoeksopzet van vergunninghouder, de fase waarin het onderzoek zich bevindt, uit welke stappen het onderzoek bestaat en hoe vergunninghouder tot de keuze van die stappen is gekomen. Dit geeft inzicht in de afwegingen van vergunninghouder op belangrijke beslispunten en in de wijze van totstandkoming van het productieproces. Deze informatie is in hoge mate concurrentiegevoelig, omdat concurrenten de informatie kunnen gebruiken voor een eigen onderzoeksstrategie in een vergelijkbare of identieke situatie. De CCD verwijst naar de uitspraak van de rechtbank Noord-Nederland van 16 oktober 2015, ECLI:NL:RBNNE:2015:4811, waaruit volgt dat de beoogde onderzoeksopzet terecht is aangemerkt als concurrentiegevoelig en als gevolg daarvan is geweigerd op grond van onevenredige benadeling.

Het belang de voornoemde informatie te weigeren wordt vergroot door het feit dat het onderzoek zich thans in de beginfase bevindt. In deze fase is het voor de concurrentie eenvoudiger te profiteren van de openbaar gemaakte informatie van vergunninghouder, omdat bekend is dat de voorsprong van vergunninghouder beperkt is. Met het openbaar maken van de geweigerde informatie is het zeer waarschijnlijk dat concurrenten met een grotere capaciteit op eenvoudige wijze deze achterstand kunnen inlopen, het geneesmiddel eerder op de markt kunnen brengen en vervolgens met eigendomsrechten beschermen. Dit heeft enorme financiële, commerciële en wetenschappelijke gevolgen.

### **Ten aanzien van bezwaar 2**

Aan deze grond wordt tegemoet gekomen.

In het bestreden besluit is reeds aangegeven dat persoonsnamen worden geweigerd. Er wordt tegemoet gekomen aan deze grond met de feitelijke handeling de betreffende naam alsnog te weigeren.

### **Ten aanzien van bezwaar 3**

Deze grond slaagt niet.

Gesteld wordt dat de instellinggegevens en de hiernaar herleidbare gegevens van vergunninghouder niet openbaar gemaakt mogen worden vanwege de vrees voor dierenrechtenextremisme en tot op heden er geen verband te leggen is tussen de vergunning (proeven) en de instelling.

De Nationaal Coördinator Terrorismebestrijding en Veiligheid (NCTV) publiceert vier maal per jaar een trendrapportage *Dreigingsbeeld Terrorisme Nederland* (hierna: DTN), waarin de voornaamste dreigingsontwikkelingen op hoofdlijnen worden geschetst. Deze rapportage is gebaseerd op informatie van de inlichtingen- en veiligheidsdiensten en van de politie, open bronneninformatie, informatie van buitenlandse partners en analyses van ambassadepersoneel en





geeft daarmee een waarheidsgetrouw beeld van de dreigingsontwikkelingen in Nederland.

Het gegeven dat in het meest recente DTN geen actueel dreigingsbeeld van dierenrechtenactivisten is opgenomen, betekent niet dat bedreigingen en intimidaties van het dierenrechtenextremisme niet meer actueel is. Het dreigingsbeeld toont de afgelopen tien jaren een afwisselend beeld met een hoger en minder hoog dreigingsbeeld. Een DTN rapportage waarin geen melding wordt gemaakt van dierenrechtenextremisme maakt niet dat de vrees voor dierenrechtenactivisme is verdwenen. De vrees dat openbaarmaking van de gevraagde gegevens kan leiden tot tegen vergunninghouders en proefdierinstellingen gerichte acties van agressie of geweld of een toename van het risico daarop kan blijven bestaan.

De aanwezigheid van bijzondere omstandigheden kunnen aanleiding blijven geven tot weigering van de namen van vergunninghouders. Vrees voor dierenrechtenextremisme is hier één van. Om die redenen is vergunninghouder gevraagd naar actuele en tegen vergunninghouder gerichte bedreigingen en intimidaties. Vergunninghouder heeft aangegeven dat er tien jaar geleden een demonstratie van dierenrechtenextremisten heeft plaatsgevonden nabij een bij de vestiging van vergunninghouder gelegen andere vergunninghouder. Ondanks dat gemachtigde van vergunninghouder heeft gesteld ook van deze locatie gebruik te hebben gemaakt, kan niet gesteld worden dat er sprake is van een actuele dreiging en intimidatie gericht op de betrokken vergunninghouder. Bovendien heeft vergunninghouder aangegeven dat er geen andere incidenten van dierenrechtenextremisten hebben plaatsgevonden.

De stelling van gemachtigde van vergunninghouder dat de aantallen dieren en het verrichten van dierproeven niet zijn verbonden aan haar cliënt en dat het soort proeven naar vergunninghouder en vervolgens naar individuele personen werkzaam bij vergunninghouder leiden, is niet nader onderbouwd en ook niet uit eigen bevindingen aangetoond. Bij de behandeling van bezwaar is gemachtigde nadrukkelijk gevraagd naar bijzondere omstandigheden die van belang kunnen zijn bij de weging van het belang van openbaarheid versus het belang van betrokken vergunninghouder. Vaststaat dat geen andere omstandigheden of feiten zijn aangevoerd. Overigens is in dit kader ook aan gemachtigde van Wob-verzoeker gevraagd het belang van zijn cliënt nader te onderbouwen. Hiervoor wordt verwezen naar het verslag van de hoorzitting.

De CCD is van oordeel dat de naam van vergunninghouder en de hiernaar herleidbare gegevens in de opgevraagde documenten openbaar kunnen worden gemaakt. Met herleidbare gegevens wordt onder meer bedoeld op bankrekeningnummers, Kamer van Koophandel nummer, adresgegevens. Het gegeven dat vergunninghouder afhankelijk is van haar commercieel onderzoek en volledig afhankelijk is van aan dierproeven gerelateerde activiteiten is naar oordeel van de CCD geen bijzonderheid. Alle vergunninghouders verrichten immers commercieel onderzoek. Universiteiten gebruiken dergelijke veelal winstgevende projecten om hun wetenschappelijk onderzoek te bekostigen. Vergunninghouders uit het bedrijfsleven verrichten onderzoek ten dienste van een winstoogmerk.

#### **Ten aanzien van de gronden van gemachtigde van Wob-verzoeker**

##### **Ten aanzien van bezwaar 1**

Deze grond slaagt.

U heeft aangegeven dat data van vergaderingen ten onrechte zijn geweigerd op grond van artikel 11 lid 1 van de Wob. Dergelijke data van vergaderingen zijn geen persoonlijke beleidsopvattingen. Ook de verwachting dat kort voor de vergaderingen een piek zal optreden in het aantal vergunningaanvragen is geen persoonlijke beleidsopvatting.

Tijdens de hoorzitting op 4 april 2017 heeft u aangegeven dat het onderhavige Wob-verzoek ziet op de correspondentie tussen de DEC's en de CCD en de aanvragers en de CCD. Hiermee heeft u het Wob-verzoek ingeperkt, waardoor de bovenstaande bezwaargrond komt te vervallen.

Aanvullend kunnen wij aangeven dat de data van vergaderingen onderdeel uitmaken van het advies van het secretariaat van de CCD aan het bestuur van de CCD. Het complete document is geweigerd op grond van artikel 11 lid 1 van de Wob. Data van vergaderingen van de CCD kunnen echter niet worden gezien als persoonlijke beleidsopvattingen ten behoeve van intern beraad. De data van vergaderingen worden middels dit besluit alsnog niet geopenbaard, omdat de data reeds openbaar zijn middels de verslagen van de vergaderingen van de CCD. Deze verslagen zijn eenvoudig te vinden op de website van de CCD, via (onder andere) de zoekterm 'verslag'.

#### **Ten aanzien van bezwaar 2**

Deze grond slaagt niet.

Bij het besluit zijn per vergunning kruisjestabellen toegevoegd. In deze tabellen staan de aangetroffen documenten naar aanleiding van het Wob verzoek. De documenten zijn genummerd en per document is opgenomen welke, indien van toepassing, weigeringsgrond(en) zijn toegepast.

Uit vaste jurisprudentie volgt dat op deze wijze voldoende inzichtelijk is gemaakt op welke grond(en) informatie wordt geweigerd. Verwezen wordt naar onder meer de uitspraak van de rechtbank Amsterdam van 29 december 2016, ECLI:NL:RBAMS:2016:9336.

Voor wat betreft de weggelakte persoonsgegevens kan gelet op onder meer de opbouw en context van de documenten worden opgemaakt om wat voor soort gegevens het gaat. Daaruit kan worden afgeleid dat de persoonsgegevens en de hiertoe herleidbare informatie is geweigerd op grond van artikel 10, tweede lid, aanhef en onder e van de Wob. In het besluit is tevens opgenomen in welke gevallen informatie is geweigerd op grond van onevenredige benadeling. Dit sluit aan bij de informatie zoals opgenomen in de kruisjestabel. Uit de kruisjestabel en uit het besluit volgt dat het advies aan het bestuur volledig is geweigerd op grond van artikel 11 Wob.

Bij enkele in het besluit genoemde documenten is informatie geweigerd op alleen de weigeringsgrond onevenredige benadeling. Ook dit volgt uit het besluit.

Het is dus zonder meer duidelijk op grond van welke uitzonderingsgrond geweigerd is een bepaalde passage of zinsnede openbaar te maken.

De openbaar gemaakte documenten zijn bovendien bij iedere vergunning vergelijkbaar. Meerdere documenten betreffen formulieren of zijn opgemaakt in een vaste opbouw, zodat het per document motiveren van de weigeringsgrond



zou leiden tot herhaling hetgeen geen doel dient. Dit geldt ook in het geval het niet gaat om geheel gelijksoortige documenten. Verwezen wordt naar rechtsoverweging 3.2 van de uitspraak van de Afdeling bestuursrechtspraak van de Raad van State van 2 september 2015, ECLI:NL:RVS:2015:2779.

### **Ten aanzien van bezwaar 3**

Deze grond slaagt deels.

In uw bezwaarschrift heeft u aangegeven dat weigeringen op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob – anders dan namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen – volstrekt niet inzichtelijk zijn. Volgens u wordt slechts aangegeven wat de vergunninghouders in hun zienswijzen hebben gesteld, maar wordt niet aangegeven wat de CCD hierover besluit.

De CCD is van oordeel dat in het besluit de zienswijzen van derde belanghebbenden zijn opgenomen en dat hierop niet in alle gevallen direct een reactie van de CCD is gekomen. Uit de context van het besluit in samenhang met de inventaris per projectvergunning, waarin is aangegeven of informatie in bepaalde documenten is geopenbaard of (deels) is geweigerd, valt echter af te leiden om welke reden bepaalde informatie is geweigerd.

In enkele gevallen is dit echter niet specifiek door de CCD benoemd. Middels dit besluit wordt derhalve alsnog gemotiveerd waarom bepaalde informatie wel of niet wordt geweigerd.

Verwezen wordt naar de behandeling van de bezwaren 5 en 6

### **Ten aanzien van bezwaar 4**

Deze grond slaagt niet.

In het bezwaarschrift van gemachtigde van Wob-verzoeker wordt gesteld dat met de weigering op grond van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer (artikel 10 lid 2 sub e Wob) vanwege dreiging van dierenrechtenactivisme wordt voorbij gegaan aan het jaarverslag van de AIVD over 2015 waarin staat dat dierenrechtenextremisme een teruglopend fenomeen is en dat het nu alleen nog vreedzame acties en demonstraties zijn. Hij stelt dat de CCD dit niet kan beoordelen en verzoekt de gegevens alsnog openbaar te maken.

In tegenstelling tot deze bezwaargrond is bij de behandeling van het bestreden besluit uitgegaan van het op dat moment beschikbare meest recente AIVD jaarverslag en DTN van de NCTV. In het bezwaarschrift verwijst gemachtigde van Wob-verzoeker slechts naar de voorgaande versies.

In de memorie van toelichting (Tweede Kamer, vergaderjaar 2012–2013, 33 692, nr. 3) wordt benadrukt dat ook tot personen herleidbare gegevens onder de weigeringsgrond eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer kunnen vallen.

Daarbij is in de memorie van toelichting aangehaald dat: *“het belang van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer zwaar moet wegen.”*

Daarbij speelt een rol dat personen die betrokken zijn bij het verrichten van dierproeven een maatschappelijke taak uitoefenen en het risico lopen slachtoffer

te worden van dierenrechtenactivisme<sup>1</sup>. In het recente verleden zijn daar veel voorbeelden van geweest. Uit vaste rechtspraak volgt dat dat ook bij de Wob een terugkerend onderwerp is.

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

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

Van belang is verder dat met het openbaar maken van persoonsnamen en tot personen herleidbare gegevens, deze gegevens voor een ieder openbaar zijn en ook openbaar blijven. Dit is benadelend voor de betrokken personen. De CCD zal de namen van personen en alle daar direct of indirect naar herleidbare gegevens blijven weigeren.

De CCD is van oordeel dat de afweging tot het wel of niet openbaar maken van persoonsgegevens een geheel andere is dan het weigeren van namen van vergunninghouders. Naar het oordeel van de CCD kan de conclusie van een afweging om informatie met betrekking tot openbaarmaking van bedrijfsnamen van vergunninghouders versus de openbaarmaking van persoonsnamen op basis van een vergelijkbaar feitencomplex van elkaar afwijken. De belangenafweging is van geheel ander aard en kent ook een ander gewicht. De hierboven genoemde overwegingen geven op zijn minst aanleiding een zwaarder gewicht toe te kennen aan de belangen van de eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer.

Het belang van weigering van persoonsgegevens en tot persoonsgegevens herleidbare informatie weegt op grond van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer zwaarder dan het publiek openbaar maken van deze informatie.

#### **Ten aanzien van bezwaren 5 en 6**

Deze grond slaagt deels.

---

<sup>1</sup> Blz. 14 Memorie van Toelichting Wet op de dierproeven



Gedurende de hoorzitting stelt gemachtigde van Wob-verzoeker dat de weigeringsgronden onevenredige benadeling en bedrijfs- en fabricagegegevens niet goed zijn toegepast bij de documenten met de NTS nummers: 2015234 en 2015339.

Ten aanzien van NTS 2016402 stelt u dat meerdere literatuurverwijzingen (referenties) ten onrechte zijn gelakt. Tegen de weigeringen in de documenten bij NTS nummer: 2015233, 2015235 en 2015236 bestaat geen bezwaar. NTS nummers 2015234, 2015338, 2015339 en 2015350 noemt u niet.

NTS:2015350

In geweigerde literatuurverwijzingen/referenties staan namen van personen die deel uit maken van de onderzoeksgroep. De onderzoeksgroep bestaat uit zeven onderzoekers. Omdat deze gegevens rechtstreeks tot de personen te herleiden zijn, worden de literatuurverwijzingen geanonimiseerd. Het belang van bescherming van deze gegevens is groter dan het belang van openbaarmaking. Gemachtigde van Wob-verzoeker heeft gedurende de hoorzitting aangegeven dat hij zich kan vinden in het weigeren van deze informatie.

NTS:2015233

In documenten 2, 5, 8 en 9 is informatie welke herleidbaar is naar de proefdierlocatie van vergunninghouder geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g en/of e van de Wob. Deze informatie staat opgenomen in document 5 in de colofon en het briefhoofd (retouradres) en in de documenten 8 en 9 waar de naar een persoon te herleiden informatie en de adresgegevens van de proefdierlocatie zijn geweigerd. Uit het besluit volgt niet om welke reden deze naam is geweigerd. In aanvulling op het primaire besluit wordt daarom het volgende gesteld.

Op de proefdierlocatie worden de proefdieren gehouden en worden de dierproeven uitgevoerd. Deze informatie kan dierenrechtenextremisten aanleiding geven tot bedreiging en intimidaties. Deze informatie is niet eerder openbaar gemaakt, ook niet in "Zodoende". In het verleden waren veel acties ook gericht tot deze proefdierlocaties.

Openbaarmaking van voornoemde informatie kan leiden tot onevenredige benadeling van de instellingen en hun medewerkers. Ter ondersteuning van dit standpunt wordt verwezen naar uitspraken van de rechtbank Den Haag, 26 februari 2016 (ECLI:NL:RBDHA:2016:3690) en de rechtbank Gelderland, 22 juli 2014 (ECLI:NL:RBGEL:2014:4543).

Informatie welke tot een persoon is te herleiden wordt geweigerd op grond van de in het primaire besluit en in dit besluit eerder opgenomen redenen van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer.

NTS:2015234

De naam van een instelling waarmee vergunninghouder samenwerkt is in document 4 op bladzijden 11 en 12 van NTS:2015234 geweigerd. Aanvullend aan het bestreden besluit wordt gesteld dat de Afdeling eveneens geen aanleiding heeft gezien namen openbaar te maken waarmee een vergunninghouder in een bepaald project samenwerkt. Verwezen wordt naar de uitspraak van de Afdeling met kenmerk ECLI:NL:RVS:2017:952. De weigering is gebaseerd op onevenredige benadeling.

Verder zijn in de bijlagen dierproeven en in het Dec advies slechts een beperkt aantal termen of (delen) van zinnen geweigerd op grond van onevenredige



benadeling. Deze informatie is rechtstreeks naar personen uit de onderzoeksgroep te herleiden. Wanneer de geweigerde informatie op internet wordt opgezocht in combinatie met de naam van vergunninghouder kan deze informatie op eenvoudige wijze worden verkregen. Naast de weigeringsgrond onevenredige benadeling kan deze informatie eveneens worden geweigerd op grond van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer.

De in het besluit geweigerde literatuur verwijzingen betreffen verwijzingen naar eigen literatuur van de onderzoeksgroep. Voor dit onderdeel wordt verwezen naar het bestreden besluit. Gemachtigde van Wob- verzoeker heeft overigens gedurende de hoorzitting aangegeven in te stemmen met het weigeren van voornoemde informatie.

NTS:2015235 en 2015236

In de bij deze NTS behorende stukken zijn het projectvoorstel en de andere inhoudelijke informatie over het project openbaar gemaakt. Slechts informatie welke tot een persoon is te herleiden wordt geweigerd op grond van de in het primaire besluit en in dit besluit eerder opgenomen redenen van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer en onevenredige benadeling.

NTS:2015338/NTS:2015339

De muizenstam in NTS:2015339 is geweigerd. Het betreft een stam die genetisch gemodificeerd is. Uit de naam kan worden afgeleid welke genetische aanpassing is gedaan, hetgeen in de context van de openbaar gemaakte informatie inzicht geeft in het project en informatie geeft over de proefopzet. Dit is onwenselijk. Op dit onderdeel is de zienswijze van betrokken vergunninghouder gevolgd. Met deze aanvullende motivering wordt geen aanleiding gezien het eerder ingenomen standpunt te herzien.

In NTS:2015338 is in de bijlagen dierproeven beschreven welke genen van de proefdieren in het project moeten worden uitgeschakeld om de functie van die genen te onderzoeken. De namen van deze genen kunnen niet openbaar gemaakt worden omdat in combinatie met de openbaar gemaakte informatie het inzicht geeft in de onderzoeksopzet, hetgeen concurrentiegevoelig is. Aanvullend wordt verwezen naar onderstaande tekst

Ten aanzien van de geweigerde delen van de onderzoeksopzet wordt aanvullend aan de overwegingen in het primaire besluit gesteld dat:

De geweigerde informatie geeft inzicht in de fase waarin het onderzoek zich bevindt. Daaruit kan opgemaakt worden uit welke stappen het onderzoek bestaat en hoe vergunninghouder tot de keuze van die stappen is gekomen. Dit geeft inzicht in de afwegingen van vergunninghouder op belangrijke beslispunten en in de wijze van totstandkoming van het productieproces. Deze informatie is in hoge mate concurrentiegevoelig, omdat concurrenten de informatie kunnen gebruiken

voor een eigen onderzoeksstrategie in een vergelijkbare of identieke situatie. De CCD verwijst naar de uitspraak van de rechtbank Noord-Nederland van 16 oktober 2015, ECLI:NL:RBNNE:2015:4811, waaruit volgt dat de beoogde onderzoeksopzet terecht is aangemerkt als concurrentiegevoelig en als gevolg daarvan is geweigerd op grond van onevenredige benadeling.

Het belang de voornoemde informatie te weigeren wordt vergroot door het feit dat het onderzoek zich thans in de beginfase bevindt. In deze fase is het voor de concurrentie eenvoudiger te profiteren van de openbaar gemaakte informatie van vergunninghouder, omdat bekend is dat de voorsprong van vergunninghouder beperkt is. Met het openbaar maken van de geweigerde informatie is het zeer





waarschijnlijk dat concurrenten met een grotere capaciteit op eenvoudige wijze deze achterstand kunnen inlopen, het geneesmiddel eerder op de markt kunnen brengen en vervolgens met eigendomsrechten beschermen. Dit heeft enorme financiële, commerciële en wetenschappelijke gevolgen.

Met deze aanvullende motivering wordt geen aanleiding gezien het eerder ingenomen standpunt te herzien.

Voor zover er literatuurverwijzingen of referenties zijn geweigerd in NTS 2015338 wordt gesteld dat dit "eigen" publicaties van leden van de onderzoeksgroep zijn. Het is hierdoor makkelijk te herleiden om welke onderzoekers het gaat van de betreffende vergunning. Deze informatie wordt dan ook geweigerd op grond van onevenredige benadeling en eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer.

NTS:2016402

In de documenten zijn de namen van samenwerkende partners geweigerd. Voor de motivering hiervoor wordt verwezen naar hetgeen onder NTS:2015234 is opgenomen.

Ten aanzien van geweigerde informatie over de onderzoeksopzet wordt verwezen naar het primaire besluit en aanvullend naar hetgeen onder NTS:2015339 is opgenomen.

Met betrekking tot de tijdens de hoorzitting genoemde geweigerde lijst van referenties wordt gesteld dat in heroverweging slechts die referenties worden geweigerd welke herleidbaar zijn naar personen uit de onderzoeksgroep. Dit heeft geresulteerd in meer openbaarmaking van de gevraagde gegevens.

#### **Verzoek proceskostenvergoeding**

De gemachtigde van Wob-verzoeker en gemachtigde van vergunninghouder hebben verzocht om proceskostenvergoeding door toepassing te geven aan artikel 7:15 Awb. Ingevolge artikel 7:15 lid 2 Awb komen de kosten die de belanghebbenden in verband met de behandeling van het gemaakte bezwaar hebben moeten maken voor vergoeding in aanmerking, indien sprake is van een herroeping van het besluit, vanwege een aan het bestuursorgaan te wijten onrechtmatigheid. Gelet op artikel 7:15 lid 2 Awb in samenhang met het Besluit proceskosten bestuursrecht hebben de gemachtigde van Wob-verzoeker en gemachtigde van vergunninghouder recht op een vergoeding van € 990,- zijnde 1 punt á € 495,- voor het ingediende bezwaarschrift en 1 punt á € 495,- voor de gehouden hoorzitting.

#### **Wijze van openbaarmaking**

Aangezien naar verwachting belanghebbenden bezwaar hebben tegen de openbaarmaking van de informatie vindt de feitelijke openbaarmaking van de documenten niet eerder plaats, dan twee weken na dagtekening van deze beschikking, conform artikel 6, vijfde lid, van de Wob. Op deze wijze wordt aan deze belanghebbenden de mogelijkheid geboden om te proberen de openbaarmaking tegen te houden.

Dit kan door het indienen van een beroepschrift bij de rechtbank én door daarnaast bij de rechtbank te verzoeken om, bij wijze van voorlopige voorziening, het onderhavige besluit tot openbaarmaking te schorsen. Indien binnen twee weken na dagtekening van dit besluit een verzoek om voorlopige voorziening is gedaan bij de rechtbank, wordt de uitspraak van de voorzieningenrechter afgewacht, voordat tot daadwerkelijke openbaarmaking wordt overgegaan.

**Beroep**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief een beroepschrift indienen. Stuur het beroepschrift naar de rechtbank in uw arrondissement. Voor meer informatie verwijst ik u naar [www.rechtspraak.nl](http://www.rechtspraak.nl).

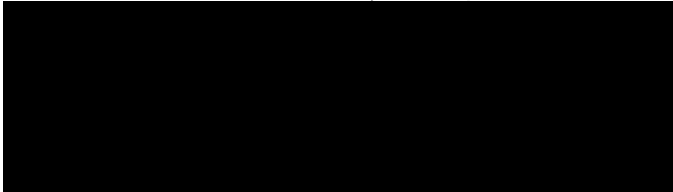
U kunt ook digitaal beroep instellen bij genoemde rechtbank via <http://loket.rechtspraak.nl/bestuursrecht>. Daarvoor moet u wel beschikken over een elektronische handtekening (DigiD). Kijk op de genoemde site voor precieze voorwaarden.

**Tot slot**

In deze brief heb ik u uitgelegd wat de reden is voor deze beslissing. Heeft u vragen, kijk dan op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Hoogachtend,

De Centrale Commissie Dierproeven,



Prof. dr. L. Hellebrekers  
Voorzitter

Inventaris Wob-verzoek W16-07S									
		wordt verstrekt			weigeringsgronden				
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2015233</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x			x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1			x					
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
7	Factuur				x		x	x	
8	Mail aanvulling onderzoeker 29-10-2015				x		x	x	
9	Mail aanvulling DEC 28-10-2015				x		x	x	
10	Advies CCD		x						x
11	Beschikking en vergunning				x		x	x	
12	Mail terugkoppeling DEC 6-11-2015				x		x	x	

01 okt 2015



1

AVD 401002015233

## 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl), of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

### 1 Gegevens aanvrager

1.1	Heeft u een deelnemernummer van de NVWA? <i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>	<input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in   40100																								
		<input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen																								
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	<table border="1"><tr><td>Naam instelling of organisatie</td><td colspan="2">Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)</td></tr><tr><td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td><td colspan="2">[REDACTED]</td></tr><tr><td>KvK-nummer</td><td>9098104</td><td></td></tr><tr><td>Straat en huisnummer</td><td>Akkermaalsbos</td><td>12</td></tr><tr><td>Postbus</td><td colspan="2">59</td></tr><tr><td>Postcode en plaats</td><td>6700AB</td><td>Wageningen</td></tr><tr><td>IBAN</td><td colspan="2">NL10RABO0397066465</td></tr><tr><td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td><td colspan="2">Wageningen UR</td></tr></table>	Naam instelling of organisatie	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]		KvK-nummer	9098104		Straat en huisnummer	Akkermaalsbos	12	Postbus	59		Postcode en plaats	6700AB	Wageningen	IBAN	NL10RABO0397066465		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR	
Naam instelling of organisatie	Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)																									
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]																									
KvK-nummer	9098104																									
Straat en huisnummer	Akkermaalsbos	12																								
Postbus	59																									
Postcode en plaats	6700AB	Wageningen																								
IBAN	NL10RABO0397066465																									
Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR																									
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	<table border="1"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td>Dhr. X Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Onderzoeker</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	Dhr. X Mw.	Functie	Onderzoeker		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]										
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	Dhr. X Mw.																								
Functie	Onderzoeker																									
Afdeling	[REDACTED]																									
Telefoonnummer	[REDACTED]																									
E-mailadres	[REDACTED]																									
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.																									
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	<table border="1"><tr><td>(Titel) Naam en voorletters</td><td>[REDACTED]</td><td>Dhr. X Mw.</td></tr><tr><td>Functie</td><td>Onderzoeker</td><td></td></tr><tr><td>Afdeling</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>Telefoonnummer</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr><tr><td>E-mailadres</td><td>[REDACTED]</td><td></td></tr></table>	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	Dhr. X Mw.	Functie	Onderzoeker		Afdeling	[REDACTED]		Telefoonnummer	[REDACTED]		E-mailadres	[REDACTED]										
(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED]	Dhr. X Mw.																								
Functie	Onderzoeker																									
Afdeling	[REDACTED]																									
Telefoonnummer	[REDACTED]																									
E-mailadres	[REDACTED]																									

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

## 2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?
- |   |
|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3   |
| <input type="checkbox"/> Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn<br>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<br>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 |
| <br><br><br>   |

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                |
|------------|----------------|
| Startdatum | 01 - 01 - 2014 |
| Einddatum  | 31 - 12 - 2016 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- |           |
|-----------|
| SeroChlam |
|-----------|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- |  |
|--|
| SeroChlam: de ontwikkeling van een test voor het aantonen van afweerstoffen tegen Chlamydia bacteriën (oa papegaaienziekte) bij vogels en pluimvee |
|--|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |  |
|-------------|--|
| Naam DEC    | DEC Wageningen UR                        |
| Postadres   | Droevendaalsesteeg 4, 6708 PB Wageningen |
| E-mailadres | dec@wur.nl                               |

## 4 Betaalgegevens

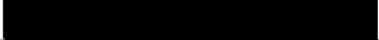
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?
- Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,- Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 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
- Bestelorder WUR 895714*
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- Appendix description animal procedures
- DEC-advies

## 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 | Wageningen

Datum | 30 - 9 - 2015

Handtekening 







## Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.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.

#### Algemeen

Chlamydiaceae zijn een groep van obligaate intracellulaire Gram-negatieve bacteriën die ziekten kunnen veroorzaken bij mensen en dieren. Onder deze groep vallen o.a. *Chlamydia psittaci* en *Chlamydia abortus* die van dier naar mens kunnen worden overgedragen (zoönosen).

*Chlamydia abortus* is een veroorzaker van abortus bij zoogdieren, voornamelijk bij schapen en geiten. Uitscheiding van deze ziekteverwekker vindt onder andere plaats via de nageboorte, het vruchtwater en via de melk. *C. abortus* kan bij zwangere vrouwen abortus geven.

*Chlamydia psittaci* is de veroorzaker van psittacose en kan een groot aantal vogelsoorten en mensen besmetten. Er zijn verschillende subspecies geschreven aan de hand van sero- en genotypen. Psittacose is een meldingsplichtige aandoening bij mensen en vogels, behalve bij pluimvee. Mensen raken geïnfecteerd door het inademen van droge besmette mestdeeltjes van vogels. De symptomen bij mensen zijn meestal aspecifiek en voornamelijk worden griepachtige verschijnselen en community-acquired pneumonia (CAP) gezien. Het aantal gerapporteerde gevallen van humane psittacose in Nederland varieert tussen de 25 en 85 per jaar (RIVM). Echter, dit zou een behoorlijke onderschatting kunnen zijn, want uit een recente studie in Nederland blijkt dat 5% van de CAP gevallen werd veroorzaakt door *Chlamydia* spp. (Meijvis et al. 2011). Dit zou overeenkomen met 1500 van de 30,000 humane ziekenhuisopnamen tgv CAP in Nederland per jaar, veel meer dan de gerapporteerde 25 tot 85 gevallen per jaar. Een risicofactor voor humane psittacose is blootstelling aan vogels. In een studie naar veehouderij en omwonenden werd een verhoogd risico op CAP gezien bij mensen die in de nabijheid van pluimveebedrijven woonden (Smit et al. 2012).

Voor geen enkele *Chlamydia* species is een effectief vaccin op de markt. Vooralnog is behandeling met antibiotica het enige effectieve middel om *Chlamydia* te bestrijden.

#### Diagnostische serologische testen

Er is op dit moment geen goede onderscheidende serologische test voor *C. psittaci* en andere *Chlamydia* species zoals *C. avium*, *C. gallinacea*, *C. ibidis*, *C. abortus* of *C. caviae*. Veterinair schrijft de OIE als standaard voor het aantonen van antilichamen tegen *C. psittaci* een complement fixatietest (CF) voor. In deze test wordt een genus-specifiek lipopolysaccharide antigeen gebruikt, waardoor onderscheid tussen *C. psittaci* en andere Chlamydiaceae niet mogelijk is. Onderscheidend vermogen van de gebruikte diagnostiek is juist bij vogels belangrijk vanwege bronopsparing (zoeken naar een dierlijke bron in het geval van een humane besmetting) maar ook omdat recentelijk nieuwe *Chlamydia* soorten bij vogels zijn beschreven (*C. gallinacea* en *C. avium*; Sachse, 2014). Verder onderscheid tussen de verschillende genotypen binnen de *C. psittaci* groep in het kader van bronopsparing is ook niet mogelijk met de huidige methode.

Andere serologische testen op basis van ELISA, latex agglutinatie, elementaire-deeltjes agglutinatie, micro-immunofluorescentie of agar-diffusietesten worden ook gebruikt, maar met zeer wisselende en veelal niet reproduceerbare resultaten (OIE, Terrestrial manual 2012).

#### Genotypering van *C. psittaci*

De bacterie *C. psittaci* kan op basis van zijn DNA onderverdeeld worden in verschillende genotypen die overlappen met de serotypen. Op dit moment zijn er negen genotypen op basis van het ompA gen beschreven. De meeste van deze genotypen komen predominant voor in bepaalde vogelsoorten. Zo wordt genotype A bijvoorbeeld voornamelijk teruggevonden bij papegaaiaachtigen en genotype B bij duiven. Voor zover bekend is de mens gevoelig voor alle genotypen. Genotypering is dus belangrijk voor bronopsporing, en een serologische test waarbij onderscheid kan worden gemaakt tussen de verschillende genotypen zou daarom van aanvullende waarde zijn. Genotypering kan nu alleen nog worden uitgevoerd op DNA van de bacterie (op basis van ompA DNA-sequenties). Detectie op basis van antilichamen heeft als voordeel dat deze over het algemeen langer aantoonbaar blijven dan het agens. Bovendien zijn voor monitoringsdoeleinden bloedmonsters vaak makkelijker verkrijgbaar en is het uitvoeren van routinematige serologie eenvoudig en goedkoop.

#### Ontwikkeling van een serologische test

De hierboven beschreven achtergrond maakt de ontwikkeling van een serologische test, waarbij niet alleen antilichamen specifiek tegen *C. psittaci* kunnen worden aangetoond maar ook antilichamen tegen de andere Chlamydia species en tegen de verschillende *C. psittaci* genotypen kunnen worden onderscheiden, zeer wenselijk. Een dergelijke test kan worden ingezet voor bronopsporing bij humane besmettingen en voor screeningsdoeleinden van vogels (gezelschapsvogels en pluimvee). Om deze test te kunnen ontwikkelen en te optimaliseren zijn goed gedefinieerde vogelsera nodig: dat zijn sera waarvan bekend is tegen welke Chlamydia species en genotype de serumantilichamen zijn opgewekt. Deze sera kunnen alleen door middel van een dierproef worden verkregen.

In 2014 is reeds ervaring opgedaan met een infectieproef bij kippen, waarbij kippen met één *C. psittaci* stam werden geïnfecteerd. De kennis uit deze eerdere proef is gebruikt om tot een aanvraag te komen van een vervolproef om een breder palet aan sera met specifieke antilichamen te verkrijgen.

#### Referenties:

RIVM. [http://www.rivm.nl/Onderwerpen/P/Papegaaienziekte\\_psittacose](http://www.rivm.nl/Onderwerpen/P/Papegaaienziekte_psittacose), pagina bezocht op 01-09-2015.

Meijvis SC, Hardeman H, Remmelts HH, Heijligenberg R, Rijkers GT, van Velzen-Blad H, et al. Dexamethasone and length of hospital stay in patients with community-acquired pneumonia: a randomised, doubleblind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2011;377:2023-30.

Smit, L. A., van der Sman-de Beer, F., Opstal-van Winden, A. W., Hooiveld, M., Beekhuizen, J., Wouters, I. M., Yzermans, J. and Heederik, D. (2012) 'Q fever and pneumonia in an area with a high livestock density: a large population-based study', *PLoS One*, 7(6), e38843.

K. Sachse et al. Evidence for the existence of two new members of the family Chlamydiaceae and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 37 (2014) 79–88.

---

### 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?

Er is op dit moment geen bruikbare serologische test voor de detectie van antilichamen tegen Chlamydia bij vogels beschikbaar. Het doel van dit project is de ontwikkeling van een subspecies-specifieke serologische test voor het aantonen van antilichamen tegen Chlamydiaceae met focus op *Chlamydia psittaci* bij vogels/pluimvee. Deze test kan ingezet worden voor bronopsporing bij humane besmettingen en ook bij de screening van vogels/pluimvee. Het verkrijgen van sera door middel van een dierproef is een hier een onderdeel van.

---

### 3.3 Belang

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

Op dit moment is over het voorkomen van *C. psittaci* bij pluimvee in Nederland nog weinig bekend, maar studies in België en Frankrijk hebben laten zien dat pluimvee een bron van *C. psittaci* is voor mensen (Dickx 2010). Het is van maatschappelijk belang om een serologische test te ontwikkelen waarmee pluimvee eenvoudig kan worden getest op het voorkomen van antilichamen tegen *C. psittaci*. Met kennis over het voorkomen van *C. psittaci* in Nederlands pluimvee kan worden ingeschat of er maatregelen nodig zijn om infecties bij mensen te voorkomen. Ook kan de test eventueel bij (hobby)vogels worden ingezet in het kader van bronopsporing.

Er is op dit moment geen differentiële serologische test beschikbaar voor Chlamydiaceae beschikbaar; indien de ontwikkeling van een dergelijke test slaagt, zou dat wetenschappelijk gezien een doorbraak zijn.

Referenties:

V. Dickx, T. Geens, T. Deschuyffeleer, L. Tyberghien, T. Harkinezhad, D. S. A. Beeckman, L. Braeckman and D. Vanrompay. *Chlamydophila psittaci* Zoonotic Risk Assessment in a Chicken and Turkey Slaughterhouse. *J. Clin. Microbiol.* 2010, 48(9):3244.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

1. Middels beschikbare genoomsequenties en lopende reversed vaccinologie bioinformatica tools is gezocht naar serotype- en species-specifieke antigenen en/of epitopen. De geïdentificeerde antigenen zullen middels een bij [REDACTED] opgezet proteïne array platform tot expressie worden gebracht.
2. Voor de screening zijn serotype- en species specifieke sera nodig die via een dierproef kunnen worden verkregen. Deze kunnen worden gemaakt middels immunisatie van proefdieren met diezelfde antigenen, en middels immunisatie van dieren met geïnactiveerde whole cell preparaten van de diverse *Chlamydia* species. De dierproef wordt in twee fases uitgevoerd: in fase 1 worden de dieren geïmmuniseerd met de geïdentificeerde antigenen en de diverse *Chlamydia* species. Afhankelijk van de resultaten van fase 1 kan een gedeelte (maximaal 25%) van de immunisaties worden herhaald in fase 2. Fase twee wordt op dezelfde manier uitgevoerd als fase 1.
3. ELISA's, of daarvan afgeleide testen, zullen worden opgezet (mogelijk in multiplex), waarbij getracht zal worden een gastheer-brede test te ontwikkelen door gebruik te maken van breed tegen vogel-immunoglobuline reagerende secundaire antistoffen.
4. Met behulp van de ontwikkelde test(en) zal binnen een routinematige pluimvee monsterstroom worden gekeken naar het voorkomen van *C. psittaci* (en andere *Chlamydia* species) in Nederland.

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

In het tweede onderdeel van het project (zie 3.4.1) wordt een dierproef uitgevoerd:

Dierproef 1: Het opwekken van antilichamen tegen *Chlamydia* (deze proef bestaat uit twee fasen).

Fase 1:

In totaal zullen tegen 78 (10+50+18) antigenen en 8 (4+4) controles antilichamen worden opgewekt. Deze zijn onder te verdelen in vijf groepen:

1. Hele bacterie: verschillende soorten *Chlamydia* (10)
2. Differentiërende antigenen: geselecteerd op basis van bio-informatica (50)
3. Verschillende OmpA varianten: om genotype specifieke test te kunnen maken, 2 per OmpA genotype (18)

4. Controlegroep (lege gastheercellen van de Chlamydia kweek) (4)
5. Controlegroep (expressie systeem recombinante eiwitten) (4)

Per antigeen of controle worden twee kippen gebruikt. Het aantal twee is gekozen om bij een non-respons (niet tot geringe aanmaak van antilichamen) van een dier toch voldoende serum met antilichamen op te kunnen wekken.

Fase 2 (optioneel):

De verwachting is dat in de eerste fase van de dierproef de gewenste sera gemaakt kunnen worden. Echter, omdat er een kans bestaat dat de proef op onderdelen suboptimaal verloopt, heeft de proef een tweede fase waarin een gedeelte van het experiment (maximaal 25%) herhaald kan worden als dat nodig is. Mogelijke punten die problemen kunnen opleveren zijn bijvoorbeeld als beide dieren geen optimale respons geven (lage antilichaamproductie). Per antigeen zal kritisch bekeken worden of er redenen zijn om aan te nemen dat een herhaling wel sera zal opleveren die voldoende antilichamen bevatten. Als die redenen er niet zijn zal er geen herhaling worden uitgevoerd met dat antigeen.

Het inbouwen van de mogelijkheid om een gedeelte van de proef te herhalen als dat nodig is, vergroot de kans op succes, namelijk een complete set sera met specifieke antilichamen die ingezet gaan worden om de ontwikkelde serologische test goed te evalueren.

---

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 project bestaat uit 4 onderdelen (zie 3.4.1).

1. Middels beschikbare genomesequenties en lopende reversed vaccinologie bioinformatica tools is gezocht naar serotype- en species-specifieke antigenen en/of epitopen. De geïdentificeerde antigenen zullen middels een bij [REDACTED] opgezet proteïne array platform tot expressie worden gebracht.  
*Er zijn inmiddels antigenen geïdentificeerd, en er is gestart met de expressie van de eiwitten. Als alle of het grootste gedeelte van de eiwitten tot expressie is gebracht wordt verder gegaan met onderdeel 2.*
2. Voor de screening zijn serotype- en species specifieke sera nodig die via een dierproef kunnen worden verkregen. Deze kunnen worden gemaakt middels immunisatie van dieren met diezelfde antigenen, en middels immunisatie van dieren met geïnactiveerde whole cell preparaten van de diverse Chlamydia species.  
*Dit onderdeel is geslaagd als alle of een subset van de immunisaties sera opleveren die reageren met de voor immunisatie gebruikte antigenen. Er wordt verder gegaan met onderdeel 3.*
3. ELISA's, of daarvan afgeleide testen, zullen worden opgezet (mogelijk in multiplex), waarbij getracht zal worden een gastheer-brede test te ontwikkelen door gebruik te maken van breed tegen vogel-immunoglobuline reagerende secundaire antistoffen.  
*Dit onderdeel is geslaagd als er met voldoende antigenen voor een specifieke of een generieke test een serologische assay kan worden opgezet voor gebruik in vogelsera. Er wordt verder gegaan met onderdeel 4.*
4. Met behulp van de ontwikkelde test(en) zal binnen een routinematige pluimvee monsterstroom worden gekeken naar het voorkomen van *C. psittaci* (en andere Chlamydia species) in Nederland.





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

Volgnummer	Type dierproef
1	Immunisatieproef waarbij antilichamen tegen Chlamydia worden opgewekt bij kippen.
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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 1          | Immunisatieproef waarbij antilichamen tegen Chlamydia worden opgewekt bij kippen |
- 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 experiment wordt gedaan om kippenserum met antilichamen tegen diverse vormen van de Chlamydia bacterie te verkrijgen, welke gebruikt zullen worden voor de ontwikkeling van een serologische test. Kippen zullen worden geïmmuniseerd met verschillende soorten niet infectieus Chlamydia antigeen, zowel eiwitten als de gehele geïnactiveerde bacterie. Er is gekozen voor kippen omdat dit het voornaamste doeldier is voor de te ontwikkelen test. De dieren worden geïmmuniseerd (injecteren van het antigeen samen met een adjuvans) in plaats van geïnfecteerd via een natuurlijke route omdat een experiment met een infectie via natuurlijke weg veel complexer is. Dit komt deels doordat *C. psittaci* een BSL-3 organisme is waardoor het experiment onder extra veiligheidsrestricties moet worden uitgevoerd. Voor een immunisatieproef met niet infectieus materiaal is dit niet nodig. Bovendien moeten dieren die geïnfecteerd worden apart van elkaar gehuisvest worden om kruisbesmettingen te voorkomen, terwijl bij immunisaties de dieren allemaal in één groep kunnen worden gehouden.

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.

Eerste fase van de proef: de dieren zullen een week voor de immunisatie worden aangevoerd om te kunnen acclimatiseren in hun nieuwe omgeving. Bij aankomst zal 1-2 ml bloed worden afgenomen om te controleren of er geen antistoffen tegen Chlamydia aanwezig zijn. Na 1 week krijgen de kippen een eerste injectie met het antigeen vermengd met een adjuvans. Twee weken na de eerste immunisatie wordt bij de dieren 1-2 ml bloed afgenomen en worden ze geboosterd met een tweede injectie met hetzelfde antigeen vermengd met een adjuvans. De tweede bloedafname wordt gedaan om na te gaan of er nog een substantiële stijging van de hoeveelheid antilichamen plaatsvindt ten gevolge van de booster. Deze kennis kan gebruikt worden om soortgelijke experimenten in de toekomst te verfijnen, als blijkt dat een enkele

injectie voldoende is. Drie weken na de booster zal van alle kippen maximaal bloed worden afgenomen onder narcose en worden de dieren geëuthanaseerd.

Tweede fase van de proef (optioneel): hierbij zal de eerste fase exact worden herhaald, met een kleinere groep dieren (maximaal 25%). Of de tweede fase plaatsvindt is afhankelijk van de resultaten van de eerste fase.

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

Met behulp van bio-informatica is het aantal antigenen bepaald wat nodig is om te kunnen differentiëren tussen de verschillende groepen en genotypes.

In totaal zullen 78 antigenen en 8 controles worden getest. Deze zijn onderverdeeld in vijf groepen:

- 1) Hele bacterie: verschillende soorten Chlamydia, de bacteriën zijn geïnactiveerd (10)
- 2) Differentiërende antigenen: geselecteerd op basis van bio-informatica (50)
- 3) Verschillende OmpA varianten: om genotype specifieke test te kunnen maken, 2 per OmpA genotype (18)
- 4) Controlegroep (lege gastheercellen van de Chlamydia kweek) (4)
- 5) Controlegroep (expressie systeem recombinante eiwitten) (4)

Per antigeen of controle worden twee kippen gebruikt. Het aantal twee is gekozen om bij een non-respons (niet tot geringe aanmaak van antilichamen) toch voldoende serum met antilichamen op te kunnen wekken. Uit ervaring is namelijk gebleken dat er verschillen zitten tussen de hoogte van de antilichaamrespons tussen dieren onderling.

## B. De dieren

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

SPF witte leghorns, afkomstig van een geregistreerd fokbedrijf. Het totale aantal dieren is 224: voor de eerste fase van de proef zijn 180 dieren nodig (172 dieren en 8 dieren extra in verband met onvoorziene sterfte voor aanvang van de proef). Voor de tweede fase zijn dit maximaal 44 dieren (42 dieren en 2 extra in verband met onvoorziene sterfte). De leeftijd is minimaal 6 weken omdat jongere dieren een kleiner bloedvolume hebben en daardoor onvoldoende serum met antilichamen kan worden verkregen per dier.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

### Vervanging:

Kippenantilichamen kunnen niet op een kunstmatige manier worden gemaakt. Er zijn dus dieren nodig om deze antilichamen te verkrijgen. Soms zijn al eerdere dierproeven gedaan en kunnen deze antilichamen commercieel worden verkregen. De antilichamen waar wij naar op zoek zijn, zijn echter niet commercieel beschikbaar. Ook kunnen geen bestaande bloedmonsters van screeningsprogramma's voor kippen worden gebruikt, omdat daarvan onbekend is met welke ziekteverwekkers de kippen in contact zijn geweest.

### Vermindering:

Het aantal dieren per antigeen is tot een minimum teruggebracht: er worden per antigeen steeds twee kippen gebruikt, omdat de immuunrespons van het ene dier kan verschillen van het andere dier.

Vooraf is met behulp van bio-informatica een inschatting gemaakt welke antigenen getest moeten worden.

Op die manier kan het aantal antigenen en dus het aantal dieren worden beperkt.

*Verfijning:*

Kippen zullen worden geïmmuniseerd met verschillende soorten niet infectieus Chlamydia antigeen, hierdoor ontstaan er geen ziekteverschijnselen door de bacterie zelf. Aan het eind van de proef wordt maximaal bloed afgenomen onder narcose.

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 in groepen gehouden in een omgeving die aansluit bij hun behoeften wat betreft management van klimaat, licht, strooisel en voer en watervoorziening. De dieren worden het gehele experiment op strooisel gehouden.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

Er is gezocht naar commercieel verkrijgbare antilichamen, deze zijn niet beschikbaar voor de antigenen die wij willen testen. Dit komt overeen met het feit dat er tot nu toe geen differentiërende test voor Chlamydia bestaat.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Er worden geen levende bacteriën ingebracht, de bacteriën zijn vooraf geïnactiveerd, dus de bacteriën zelf veroorzaken geen ziekteverschijnselen. De injecties (antigeen met adjuvans) kunnen plaatselijk een

ontstekingsreactie veroorzaken die lokale pijn veroorzaakt. Het lokaal toedienen van pijnstillers bij de kippen is niet mogelijk. Het systemisch toedienen van pijnstillers weegt niet op tegen het plaatselijke ongerief bij de dieren.

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

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er wordt 2 keer een subcutane injectie van antigeen met adjuvans toegediend, en er wordt 2 keer 1-2 ml bloed afgenomen. Aan het eind van de proef wordt onder narcose maximaal bloed afgenomen bij de dieren. Hierna worden de dieren geëuthanaseerd. Er worden geen welzijnsaantastingen voorzien die gerelateerd zijn aan een infectie aangezien er alleen niet-infectieus materiaal aan de dieren wordt toegediend. Ook kan een dier onverhoopt ziek of gewond raken.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Dit kunnen allerlei oorzaken zijn maar bij kippen kan kannibalisme een rol spelen.

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

De dieren hebben voldoende ruimte en worden gehouden op strooisel waardoor er voldoende afleiding is.

### 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.

We verwachten niet dat dieren het humane eindpunt zullen bereiken als direct gevolg van het experiment, omdat in het experiment voornamelijk een lokale reactie wordt opgewekt. Echter in elk dierexperiment kunnen dieren onverhoopt ziek worden of verwond raken.

Zodra wordt waargenomen dat een dier: niet meer overeind kan komen, niet meer kan eten of drinken, verschijnselen van ernstige depressie laat zien (nauwelijks respons op stimuli), ernstige benauwdheid of een ander ernstig ongerief laat zien dan zal het dier geëuthanaseerd worden.

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

1-2% van de dieren

### K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Matig ongerief;

Er wordt 2 keer een subcutane injectie toegediend met daarin een antigeen met adjuvans, er wordt 2 keer 1-2 ml bloed afgenomen. Aan het eind van de proef wordt onder narcose maximaal bloed afgenomen bij de dieren en aansluitend worden de dieren geëuthanaseerd.

## 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.

Bij de dieren wordt maximaal bloed afgenomen en ze zullen vervolgens worden geëuthanaseerd.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.



Ja

---



[Redacted]

Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Dierexperimenten  
Commissie WUR

DATUM  
29 september 2015

ONDERWERP  
aanvraag projectvergunning  
AVD401002015233

ONS KENMERK  
AVD401002015233

BEZOEKADRES  
[Redacted]

INTERNET  
www.wageningenUR.nl

KVK NUMMER  
09098104

CONTACTPERSOON  
[Redacted]

TELEFOON  
[Redacted]

E-MAIL  
[Redacted]

Geachte CCD,

Onderstaand het advies dat de DEC-WUR heeft gegeven aangaande het project "Serochlam"

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer: **AVD401002015233**
2. Titel van het project: Serochlam
3. Titel van de NTS: Serochlam: de ontwikkeling van een test voor het aantonen van afweerstoffen tegen Chlamydia bacteriën (oa papegaalenziekte) bij vogels en pluimvee
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:  
DEC-WUR  
[Redacted]  
Secretaris: [Redacted]
6. Adviestraject  
Ontvangen door DEC: 09-09-2015  
Aanvraag compleet: 09-09-2015  
In vergadering besproken: 21-09-2015
7. Correspondentie met de aanvrager  
Datum vragen: 22-09-2015  
Strekking van de vragen:
  - De DEC heeft vragen gesteld over:
    - o Go-no go na fase 1
    - o Tekstuele verduidelijking HEPDatum antwoorden:  
Strekking van de antwoorden:
  - op vragen van de DEC:
    - o na fase 1 wordt bekeken of het zinvol is om fase 2 uit te voeren
    - o de tekstuele wijziging is doorgevoerd.De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.

DATUM  
29 september 2015

ONS KENNEMERK  
AVD401002015233

PAGINA  
2 van 3

### **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

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

### **C. Beoordeling (inhoud)**

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord is.
2. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstelling.
3. Het belang van het project, te weten het ontwikkelen van een serologische test voor het opsporen van *C. psittaci*, wordt door de DEC onderschreven en beoordeeld als een substantieel belang. Hoewel een groot deel van de patiënten geen ernstige ziekteverschijnselen vertoont is het een belangrijke ziekte waarvan de incidentie mogelijk onderschat wordt.
4. De DEC stelt vast dat de expertise van de onderzoekers, de voorzieningen waar de experimenten uitgevoerd worden en de onderzoeksstrategie kunnen zeker leiden tot het behalen van de doelstelling van het project.
5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "moderate" realistisch is ingeschat en geëvalueerd. Ongerief in de experimenten zal bestaan uit injecties, bloedafname en toediening anesthesie t.b.v. terminale verbloeding.
7. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. Synthetische antilichamen die op dit fijne niveau discrimineren zijn niet beschikbaar.
8. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Verdere vermindering van het aantal dieren is in de ogen van de DEC niet mogelijk. Men maakt al gebruik van een minimaal aantal dieren door in de eerste fase bewust te kiezen voor 2 dieren en dan in een later stadium nog extra dieren te gebruiken indien beide dieren niet responderen. Juist door op voorhand geen reservedieren in te zetten, maar achteraf pas extra dieren in te zetten indien dat mogelijk is, wordt maximaal invulling gegeven aan vermindering. De aanvrager beschikt over voldoende expertise om te voorkomen dat eerder gedaan onderzoek herhaald wordt.
9. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. De DEC is van mening dat het weglaten van het adjuvans tot verfijning zou kunnen leiden maar dat het weglaten in dit project niet gewenst is omdat er in dat geval een lagere respons bij de dieren optreedt waardoor er meer dieren ingezet zullen moeten worden om de doelstelling van het project te behalen. De DEC is overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
10. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken.
11. 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

- De DEC is in consensus van mening dat het doel en de haalbaarheid van het project het gebruik van proefdieren en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan rechtvaardigt. Dit project kan een bijdrage leveren aan inzicht in het vóórkomen en voorkómen van *C. psittaci*. De uitvoering is verder niet in strijd met andere ethische overwegingen m.b.t. het gebruik van proefdieren.
- In de afweging heeft de DEC meegewogen dat het ongerief in de proef met name wordt bepaald door het gebruik van adjuvans. De DEC is van mening dat de inschatting van het ongerief veroorzaakt door adjuvantia in het algemeen gebaseerd op laboratoriumdieren en heeft de ervaring dat in landbouwhuisdieren het ongerief lager is.

DATUM  
29 september 2015

DNS KENMERK  
AVD401002015233

PAGINA  
3 van 3

#### E. Advies

1. Advies aan de CCD:
  - De DEC adviseert de vergunning te verlenen.
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

Met vriendelijke groet







> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stg DLO

Postbus 59  
6700 AB WAGENINGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD401002015233

**Bijlagen**

2

Datum 1 oktober 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED],

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 oktober 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD401002015233. 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](http://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

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 40100

Naam instelling of organisatie: Stg DLO

Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde:

KvK-nummer: 9098104

Straat en huisnummer: Akkermaalsbos 12

Postbus: 59

Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN

IBAN: NL10RABO397066465

Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Wageningen UR

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam:

Functie:

Afdeling:

Telefoonnummer:

E-mailadres:



Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: ██████████  
Functie: Onderzoeker  
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 2014  
Geplande einddatum: 31 december 2016  
Titel project: SeroChlam  
Titel niet-technische samenvatting: SeroChlam: de ontwikkeling van een test voor het aantonen van afweerstoffen tegen Chlamydia bacteriën (oa papegaaienziekte) bij vogels en pluimvee  
Naam DEC: DEC Wageningen UR  
Postadres DEC: Droevendaalsesteeg 4 6708 PB Wageningen  
E-mailadres DEC: dec@wur.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
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:

Wa

Datum:

30 september 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stg DLO

[Redacted]  
Droevendaalsesteeg 4  
6708 PB WAGENINGEN  
[Barcode]

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD401002015233  
**Bijlagen**  
2

Datum 1 oktober 2015  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 1 oktober 2015  
Vervaldatum: 31 oktober 2015  
Factuurnummer: 15700233  
Ordernummer: WUR895714

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002015233	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stg DLO

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  
AVD401002015233  
**Bijlagen**  
2

Datum 1 oktober 2015  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 1 oktober 2015  
Vervaldatum: 31 oktober 2015  
Factuurnummer: 15700233  
Ordernummer: WUR895714

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD401002015233	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

[REDACTED]

---

**Van:** Info-zbo <info@zbo-ccd.nl>  
**Verzonden:** donderdag 29 oktober 2015 14:58  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: Aanvullende informatie AVD401002015233

Beste [REDACTED]  
Naar aanleiding van onderstaande e-mail hebben we telefonisch contact gehad, hierbij een korte terugkoppeling. Je hebt uitgelegd dat 3 weken na de booster een "veilig" moment is voor bloedverzameling, aangezien niet verwacht wordt dat het aantal antilichamen tegen die tijd al afneemt. De aanvraag wordt op dit moment niet aangepast naar 2 weken i.p.v. 3 weken.

Met vriendelijke groet,

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** donderdag 29 oktober 2015 11:53  
**Aan:** 'Info-zbo'; [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: Aanvullende informatie AVD401002015233

Beste [REDACTED]

We hebben navraag gedaan bij een aantal collegae onderzoekers die ervaring hebben met het immuniseren van kippen. Het is volgens deze onderzoekers o.h.a. zo dat drie weken na een booster-immunisatie de antilichaamtiter waarschijnlijk nog niet aan het afnemen is. Echter, de titer neemt bij nader inzien in de derde week na de booster-immunisatie ook niet (veel) meer toe. Op grond van deze algemene ervaringen lijkt het mogelijk om de bloedmonsters twee weken na de booster-immunisatie te nemen, in plaats van na een periode van drie weken. Er blijven onzekerheden; we weten niet hoe de immuunrespons op de diverse Chlamydia antigenen zal zijn. Echter, op grond van de beschreven ervaringen lijkt een wijziging inderdaad wel mogelijk.

In een gewijzigde versie zou, zoals beschreven in de aanvraag, tweemaal 1-2 ml bloed worden afgenomen (eerste keer: vóór de eerste immunisatie; tweede keer: twee weken na de eerste immunisatie, vóór de booster-immunisatie), en één keer zoveel mogelijk bloed, onder narcose gevolg door euthanasie, twee weken (i.p.v. drie) na de booster-immunisatie.

Ik hoop uw vraag zo afdoende beantwoord te hebben, en hoor graag z.s.m. wat er aan uw zijde of onze zijde aan vervolgactie nodig is, en gaan er vanuit dat de behandeling van de aanvraag verder voorspoedig zal verlopen.

Met vriendelijke groet,

---

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

**Sent:** dinsdag 27 oktober 2015 16:46

**To:** [REDACTED]

**Cc:** [REDACTED]

**Subject:** Aanvullende informatie AVD401002015233

Beste onderzoeker,

We zijn bezig met de behandeling van uw aanvraag AVD401002015233, getiteld: "serochlam".

Wij hebben nog een vraagje over deze aanvraag.

Beschreven in deze aanvraag is het immuniseren en toedienen van booster vaccinatie van de dieren. Van deze dieren wordt vlak voor de booster een bloedmonster afgenomen om te bepalen of de tweede vaccinatie nog een extra effect op de antilichaam-respons heeft. Na de booster-vaccinatie wordt alleen na 3 weken een bloedmonster genomen. Drie weken na de booster bloed afnemen is mogelijk de antilichaamrespons al aan het afnemen. Heeft u erover nagedacht om ook, bijvoorbeeld 1-2 weken na de booster-vaccinatie, een bloedmonster af te nemen om te zien of mogelijk de piek van de antilichaamrespons eerder plaatsvindt?

Kunt u deze vraag bij voorkeur uiterlijk donderdag aanstaande beantwoorden?

De behandeling van uw aanvraag wordt opgeschort tot het moment dat wij de aanvullende informatie hebben ontvangen. Na ontvangst van uw reactie op deze vraag, zullen wij uw aanvraag verder inhoudelijk beoordelen.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven

**Van:** DEC <dec@wur.nl>  
**Verzonden:** woensdag 28 oktober 2015 10:06  
**Aan:** 'Info-zbo (info@zbo-ccd.nl)'  
**Onderwerp:** FW: Vraagje betreffende aanvraag AVD401002015233

**Categorieën:** Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED]

Aanvullend op onderstaand antwoord kan nog toegevoegd worden dat de DEC vindt dat de onderzoeker voldoende kennis en ervaring heeft om de momenten van bloedafname zo gekozen te hebben dat de piek niet eerder verwacht wordt en dus gemist wordt.

m.vr.gr. [REDACTED]

---

**From:** DEC  
**Sent:** dinsdag 27 oktober 2015 10:06  
**To:** 'Info-zbo'  
**Subject:** RE: Vraagje betreffende aanvraag AVD401002015233

Beste [REDACTED]

De DEC heeft niet expliciet gesproken over een eerdere bloedafname na de booster.

Met vriendelijke groeten,

[REDACTED]

-----  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
*tel:* [REDACTED]  
*fax:* [REDACTED]  
*e-mail:* [REDACTED]  
[REDACTED]

Dit bericht is uitsluitend bestemd voor geadresseerde. Het bericht kan vertrouwelijke informatie bevatten. Gebruik door derden of openbaarmaking van dit bericht zonder toestemming van de [REDACTED] is niet toegestaan. Als u dit bericht per abuis heeft ontvangen, wordt u verzocht het te vernietigen en ons te informeren.

---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** woensdag 21 oktober 2015 10:32  
**To:** DEC  
**Cc:** Info-zbo  
**Subject:** Vraagje betreffende aanvraag AVD401002015233

Beste DEC,

U heeft ons een advies gegeven betreffende aanvraag AVD401002015233, getiteld: "serochlam". Wij hebben nog een klein vraagje over deze aanvraag.

Beschreven in deze aanvraag is het immuniseren en toedienen van booster vaccinatie van de dieren. Van deze dieren wordt vlak voor de booster een bloedmonster afgenomen om te bepalen of de tweede vaccinatie nog een extra effect op de antilichaam-respons heeft. Na de booster-vaccinatie wordt alleen na 3 weken een bloedmonster genomen. Heeft de DEC gesproken over om ook bijvoorbeeld 1-2 weken na de booster-vaccinatie ook een bloedmonster af te nemen om te zien of mogelijk de piek van de antilichaamrespons eerder plaatsvindt? Wat is de mening van de DEC hierover?

Kunt u deze vraag bij voorkeur deze week beantwoorden?

Met vriendelijke groet,



**Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)**

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl). Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Stg DLO

Postbus 59  
6700 AB WAGENINGEN



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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD401002015233

**04 NOV. 2015**

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 1 oktober 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "SeroChlam" met aanvraagnummer AVD401002015233. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 29 oktober 2015 heeft u het tijdstip van bloedafname verhelderd per e-mail en telefonisch naar aanleiding van een vraag gesteld door het secretariaat van de CCD. Uw aanvraag is hierdoor niet gewijzigd.

#### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij geldt de voorwaarde zoals genoemd in de vergunning. De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat fase 2 alleen van start mag gaan na instemming van de IvD om het onnodig gebruik van dieren te voorkomen. U kunt met uw project "SeroChlam" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 december 2015 tot en met 31 december 2016.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR gevoegd. Dit advies is opgesteld op 29 september 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 27 en 28 oktober 2015 heeft de DEC gereageerd op onze vraag. De DEC vindt dat de onderzoeker voldoende kennis en ervaring heeft om de momenten van bloedafname zo gekozen te hebben dat de piek niet eerder verwacht wordt en dus gemist wordt.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. De CCD stelt echter wel een algemene voorwaarde.

Dit 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

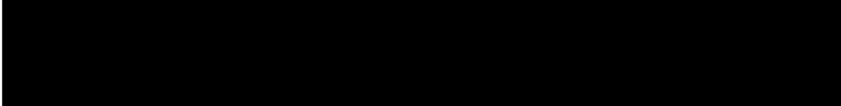
<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

#### **Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven



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: Stg DLO  
Adres: Postbus 59  
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN  
Deelnemersnummer: 40100

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 december 2015 tot en met 31 december 2016, voor het project "SeroChlam" met aanvraagnummer AVD401002015233, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 1 oktober 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 oktober 2015;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 oktober 2015;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 29 september 2015, ontvangen op 1 oktober 2015.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op

<b>Naam proef</b>	<b>Diersoort/ Stam</b>	<b>Aantal dieren</b>	<b>Ernst</b>	<b>Opmerkingen</b>
Immunisatieproef waarbij antilichamen tegen Chlamydia worden opgewekt bij kippen	Kippen / SPF witte leghorns	224	Matig / moderate	

### **Voorwaarden**

**Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen**

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat fase 2 alleen van start mag gaan na instemming van de IvD.

# 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 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.

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** vrijdag 6 november 2015 9:19  
**Aan:** 'DEC'  
**Onderwerp:** Terugkoppeling AVD401002015233

Beste DEC,

Enige tijd geleden heeft u de CCD geadviseerd betreffende aanvraag AVD401002015233, getiteld "Serochlam". Langs deze weg wil ik u melden dat de CCD uw advies gevolgd heeft, met enkel de toevoeging van de voorwaarde dat stap 2 alleen mag worden uitgevoerd na instemming van de IvD. Dit is een standaard voorwaarde.

Wij willen u bedanken voor het heldere en goed onderbouwde advies.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]  
Centrale Commissie Dierproeven

Inventaris Wob-verzoek W16-07S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2015234</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Niet-technische samenvatting	x							
3	Projectvoorstel				x		x	x	
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x		x	x	
6	DEC-advies				x		x	x	
7	Factuurinformatie				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Advies CCD		x						x
10	Beschikking en vergunning				x		x	x	
11	Mail terugkoppeling DEC 8-10-2015				x		x	x	



01 SEP. 2015

# 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](http://www.zbo-ccd.nl) of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

## 1 Gegevens aanvrager

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?  
*Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*

Ja > Vul uw deelnemernummer in 10300  
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

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

Naam instelling of organisatie Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen  
 Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [Redacted]  
 KvK-nummer 4 1 0 5 5 6 2 9

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.  
*Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*

Straat en huisnummer Geert Groteplein 10  
 Postbus 9101  
 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]  Dhr.  Mw.  
 Functie Postdoc  
 Afdeling [Redacted]  
 Telefoonnummer [Redacted]  
 E-mailadres [Redacted]

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

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



## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 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, factuurinformatie

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:

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

Naam [REDACTED]

Functie [REDACTED]

Plaats Nijmegen

Datum 31 - 08 - 2015

Handtekening [REDACTED]

### Form Project proposal

- This form should be used to write the project proposal of animal procedures.
- The appendix 'description animal procedures' is an appendix to this form. For each type of animal procedure, a separate appendix 'description animal procedures' should be enclosed
- For more information on the project proposal, see our website([www.zbo-ccd.nl](http://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.  | Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer's disease |

## 2 Categories

- |     |   |  |
|-----|---|--|
| 2.1 | Please tick each of the following boxes that applies to your project. | <input type="checkbox"/> Basic Research<br><input checked="" type="checkbox"/> Translational or applied research<br><input type="checkbox"/> Regulatory use of routine production<br><input type="checkbox"/> Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare dier<br><input type="checkbox"/> Research aimed at preserving the species subjected to procedures<br><input type="checkbox"/> 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 two most common types of dementia in the elderly are Alzheimer's disease (AD) and vascular dementia (VaD). AD is characterised by progressive cognitive impairment (e.g. memory loss) and accumulation of amyloid (A $\beta$ ) and tau protein in the brain parenchyma and vasculature [1]. Cognitive impairment in VaD is the result of strokes in the brain and is often more stepwise than progressive [2]. AD and VaD have therefore long been treated as two separate types of dementia.

Epidemiological studies have recently established that CVD, VaD and AD are more closely linked than previously thought. For example, CVD and AD share a great number of (vascular) risk factors, including diabetes, atherosclerosis and high blood pressure [3]. Furthermore, other vascular abnormalities, such as decreased microvascular density and basement membrane thickening [4], can be detected in many AD brains. AD patients also have a higher risk for stroke [5], with about 30-50% of AD patients displaying evidence of minor and major stroke upon autopsy [6]. Although it is known that stroke can contribute to the severity of cognitive impairment in AD [7], the exact role of stroke in AD remains to be investigated. In any case, vascular disorders and AD can no longer be considered strictly separate conditions. So-called mixed dementia, with post-mortem pathological evidence for both CVD and AD, is now thought to be much more common in the elderly than any of the 'pure' forms of dementia [8]. The clinical criteria to distinguish mixed dementia from AD and other dementias however remain to be clearly defined.

Clinically diagnosing AD, VaD and other types of dementia requires a neurological evaluation of the patient combined with an evaluation of cerebrospinal fluid biomarkers (e.g. A $\beta$  and tau) and/or neuroimaging profiles. Neuroimaging techniques provide a wide range of structural and functional information that quite accurately reflect neuropathology upon autopsy [9]. Recent advances in imaging techniques now allow for the *in vivo* visualization of parameters such as brain connectivity (resting state functional magnetic resonance imaging; rs-fMRI), gray and white matter integrity (diffusion tensor imaging; DTI) and blood perfusion (arterial spin labelling; ASL). In dementia and CVD, imaging has provided valuable differential diagnostic information, demonstrating for example the atrophy patterns and A $\beta$  deposits typical for AD [10] and the lesions and network reorganizations associated with CVD [11]. It can be hypothesized that a distinctive imaging pattern of neuropathology accompanies AD that is

preceded by a stroke event. Indeed, despite possessing a course of disease suggestive of AD, imaging has revealed that mixed dementia patients have a higher rate of white matter changes than AD patients [12]. To our knowledge, this is the only imaging data on mixed dementia to date, emphasizing the need for further investigation of the neuroimaging patterns associated with this type of dementia.

To investigate the pathogenic mechanisms behind AD, transgenic animal models for AD, expressing (mutant forms of) the amyloid precursor protein (APP), have been developed. Stroke is most commonly modelled in mice by occluding the left or right middle cerebral artery (MCA) [13], either transiently (30-120 minutes) or permanently. The longer the MCA is occluded, the more severe the infarct that is generated will be. Previous studies have demonstrated that the induction of an ischemic event in AD mouse models can exacerbate AD pathology and ischemic lesion size, accompanied by an increased disturbance of cognition [14-16], thus mimicking what is seen in AD patients with stroke. None of these animal studies have however examined neuroimaging parameters, they have mainly focused on elucidating the bidirectional interaction between APP/A $\beta$  and ischemic injury and the potential role of inflammation. As advanced neuroimaging techniques are now available for small animals such as mice [17, 18], it is feasible to gain more insight into AD pathology and the role of stroke. These techniques will furthermore allow for an extensive structural and functional assessment of future treatments for stroke and/or AD.

Currently, treatment strategies for AD and stroke are still lacking. As both CVD and AD share a number of vascular risk factors [3], therapeutically addressing these factors may be beneficial for both conditions. In the Western population, vascular risk factors are closely linked to the consumption of high amounts of cholesterol, calories and saturated fats. Therefore, it can be hypothesized that changing to a healthier diet may improve the development and severity of both AD and stroke. Indeed, the so-called Mediterranean diet, consisting of relatively high amounts of fish, fruit and vegetables, has been shown to lower CVD and AD incidence and risk [19, 20]. Certain diets have even been shown to improve some of the brain damage associated with stroke and AD. For example, we have previously shown that a [REDACTED] diet, containing a specific combination [REDACTED], has a beneficial effect on neurodegenerative processes, cerebral blood flow and cognition in a mouse model for AD [21-23] and wildtype mice modelling stroke (unpublished data). It remains to be investigated if a [REDACTED] diet can also improve mixed dementia pathology and symptoms.

In conclusion, as mixed dementia is now recognized as a common form of dementia, there is a need to further characterize this type of dementia and distinguish it from 'pure' forms of AD and other dementias. Furthermore, the lack of available treatments for CVD and dementias highlights the importance of testing novel treatment strategies, for example aimed at common risk factors for both these conditions. The availability of suitable mouse models and advanced neuroimaging techniques makes the above-mentioned studies possible. It should be mentioned that sex is an important risk factor for both AD and stroke, as both conditions appear to affect women more than men [24, 25]. In contrast, male sex is considered a risk factor for mixed dementia [26]. Taking this factor into account when designing epidemiological or experimental studies investigating (mixed) dementia therefore seems highly relevant, but is in our opinion too often ignored. In our current project, we will therefore examine the effect of stroke on AD in both sexes of a mouse model for mixed dementia.

#### References

1. Selkoe, D.J., *Alzheimer's disease*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(7).
2. Pasquier, F. and D. Leys, *Why are stroke patients prone to develop dementia?* J Neurol, 1997. **244**(3): p. 135-42.

3. Breteler, M.M., *Vascular risk factors for Alzheimer's disease: an epidemiologic perspective*. Neurobiol Aging, 2000. **21**(2): p. 153-60.
4. Humpel, C., *Chronic mild cerebrovascular dysfunction as a cause for Alzheimer's disease?* Exp Gerontol, 2011. **46**(4): p. 225-32.
5. Chi, N.F., et al., *Alzheimer disease and risk of stroke: a population-based cohort study*. Neurology, 2013. **80**(8): p. 705-11.
6. Kalaria, R.N., *The role of cerebral ischemia in Alzheimer's disease*. Neurobiol Aging, 2000. **21**(2): p. 321-30.
7. Snowdon, D.A., et al., *Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease. The Nun Study*. JAMA, 1997. **277**(10): p. 813-7.
8. Schneider, J.A., et al., *Mixed brain pathologies account for most dementia cases in community-dwelling older persons*. Neurology, 2007. **69**(24): p. 2197-204.
9. Roman, G. and B. Pascual, *Contribution of neuroimaging to the diagnosis of Alzheimer's disease and vascular dementia*. Arch Med Res, 2012. **43**(8): p. 671-6.
10. Masdeu, J.C., W.C. Kreisl, and K.F. Berman, *The neurobiology of Alzheimer disease defined by neuroimaging*. Curr Opin Neurol, 2012. **25**(4): p. 410-20.
11. Dijkhuizen, R.M., et al., *Functional MRI and diffusion tensor imaging of brain reorganization after experimental stroke*. Transl Stroke Res, 2012. **3**(1): p. 36-43.
12. Rockwood, K., et al., *The diagnosis of "mixed" dementia in the Consortium for the Investigation of Vascular Impairment of Cognition (CIVIC)*. Ann N Y Acad Sci, 2000. **903**: p. 522-8.
13. Chiang, T., R.O. Messing, and W.H. Chou, *Mouse model of middle cerebral artery occlusion*. J Vis Exp, 2011(48).
14. Heikkinen, R., et al., *Susceptibility to focal and global brain ischemia of Alzheimer mice displaying abeta deposits: effect of immunoglobulin*. Aging Dis, 2014. **5**(2): p. 76-87.
15. Koistinaho, M., et al., *Beta-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse A beta deposits but do not form plaques show increased ischemic vulnerability: role of inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1610-5.
16. Zhang, F., et al., *Increased susceptibility to ischemic brain damage in transgenic mice overexpressing the amyloid precursor protein*. J Neurosci, 1997. **17**(20): p. 7655-61.
17. [REDACTED]
18. [REDACTED]
19. Estruch, R., et al., *Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet*. N Engl J Med, 2013. [REDACTED]
20. Scarmeas, N., et al., *Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease*. Ann Neurol, 2006. **59**(6): p. 912-21.
21. [REDACTED]
22. [REDACTED]
23. [REDACTED]
24. Andersen, K., et al., *Gender differences in the incidence of AD and vascular dementia: The EURODEM Studies*. EURODEM Incidence Research Group. Neurology, 1999. **53**(9): p. 1992-7.
25. [REDACTED]
26. Zekry, D., J.J. Hauw, and G. Gold, *Mixed dementia: epidemiology, diagnosis, and treatment*. J Am Geriatr Soc, 2002. **50**(8): p. 1431-8.

### 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 objectives of this project are:

- 1) Study the effect of stroke on the structure, function and perfusion of the AD brain to a) find novel (sex-specific) neuroimaging markers and/or predictors for mixed dementia and b) further elucidate (sex-specific) pathophysiological mechanisms linking stroke and AD.
- 2) Investigate the effect of a [REDACTED] diet on stroke- and AD-related cognition and brain network integrity.

To realize our objectives, mild experimental stroke will be induced in a mouse model for AD. Inducing stroke in mice has been well-described in literature (see section 3.1) and we have experience with the induction of ischemia in mice (unpublished data). To optimize the success rate of this procedure, experimental stroke induction will be performed in close collaboration with expert researchers in the field. We furthermore have access to the necessary neuroimaging facilities and behavioural equipment and have the required experience to perform neuroimaging ([REDACTED] and behavioural studies [REDACTED]. We have extensive experience working with mouse models for [REDACTED] and have extensive knowledge on the effects of [REDACTED] diets in both AD (references [REDACTED] and stroke models (unpublished data). Considering the above-mentioned experience, we believe that our objective is achievable in the 5 years requested for this project.

#### Additional references

[REDACTED]

### 3.3 Relevance

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

Social: AD is a major public health problem with patient numbers growing each year due to the aging of the world population. In part due to the highly heterogeneous nature of dementia, definite clinical diagnostics and effective treatment strategies are still lacking. Mixed dementia is now considered more common than 'pure' AD, but this type of dementia is hardly recognized to date. Distinguishing mixed dementia from other types of AD is relevant as for example patients suffering from this type of dementia may benefit from different (stroke-directed) treatment options than 'pure'

AD patients. Therefore, defining neuroimaging parameters specific for mixed dementia will not only benefit the differential diagnosis of dementias, it may potentially improve treatment outcome for a large group of dementia patients. Including the risk factor sex may furthermore enhance the personalized healthcare strategy, i.e. diagnostics and treatments tailored to individual patients, that is receiving increasing attention in medicine today.

**Scientific:** It is still unclear if ischemic events can potentiate the development of classical AD lesions or if they are a consequence of pre-existing AD pathology. It is furthermore unknown what the exact role of the risk factor sex is on the aforementioned pathology. Investigating the effect of mixed dementia and a dietary intervention on neuroimaging parameters should give us more insight into the pathological mechanisms involved in this type of dementia and the potential role of gender. This in turn may result in the identification of novel (sex-specific) therapeutic and/or diagnostic targets.

---

### **3.4 Research Strategy**

---

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

---

We aim to:

- 1) Investigate the effect of stroke on the structure, function and perfusion of the AD brain by inducing experimental stroke in transgenic for APP (AD mouse model). To better align this animal experiment to different stages of human AD development, we have chosen a longitudinal design for our study. To investigate the potential role of sex, both male and female mice will (simultaneously) be used.
- 2) Investigate the acute effect of a [REDACTED] diet on cognition and neuroimaging markers after the induction of experimental stroke in mice transgenic for APP. To investigate the potential role of sex, both male and female mice will (sequentially) be used.

---

#### **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.**

---

This project will consist of two components, as specified in 3.4.1. The outline of these components is as follows:

- 1) In a transgenic mouse model for AD, motor skills and physiological parameters will be determined shortly before (baseline) and shortly after experimental stroke induction in both sexes. Shortly after a mild experimental stroke is induced, several neuroimaging techniques, such as [REDACTED] will be used to examine brain structure and function. To assess perfusion, parameters such as cerebral blood flow and vasoactivity will also be measured with imaging techniques (e.g. arterial spin labelling; ASL). The chosen neuroimaging paradigm will be repeated at least two times with a time interval of several months. Furthermore, to assess the efficacy of the ischemic stroke and the level of AD pathology, behaviour, cognition and/or motor skills will be measured at least once after the ischemic stroke, using tests such as the open field, Morris water maze and grip test. Physiological parameters (e.g. blood pressure, body weight, etc) will be monitored throughout the experiment to assess the impact of stroke and/or age-related AD pathology on the general health of the animals. Six to eight months after experimental stroke induction, mice will be sacrificed.
- 2) In a transgenic mouse model for AD, baseline cognitive and motor skills and physiological parameters will be determined shortly before experimental stroke induction. Immediately after mild experimental stroke is induced, half of the mice will be switched from a control diet to a [REDACTED] diet. A few weeks after induction of stroke, a neuroimaging paradigm similar to the one performed in component 1 will be performed to examine brain structure, function and perfusion. Furthermore, the effect of diet will be assessed in a number of behavioural tests, such as the Barnes or Morris water maze and the open field. Physiological parameters (e.g. body weight, etc) will be monitored throughout the experiment to

assess general health of the animals and the impact of stroke and/or age-related AD pathology and/or diet on the general health of the animals. About two months after experimental stroke induction, mice will be sacrificed. Due to the large number of variables being tested (e.g. diet and stroke and AD), this experiment will first be performed only in males. If improvements of treatment with a [REDACTED] diet are found in males, component 2 will be performed once more in females.

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

In the two components of this project we will try to elucidate the mechanistic, diagnostic and therapeutic implications of mixed dementia. To this end, in both components we will induce mild experimental stroke in a mouse model for AD. The first component is aimed at finding novel neuroimaging markers for mixed dementia and elucidating pathological mechanisms in this type of dementia. In this component we will furthermore take the risk factor sex into account. The second component is aimed at determining the potential therapeutic effect of a [REDACTED] diet on this type of dementia.

To study this we formulated the following milestones:

1. Combining AD pathology with stroke leads to novel (sex-specific) neuroimaging patterns that can distinguish this type of dementia from 'pure' AD and provide more mechanistic insight into mixed dementia pathology. If no immediate effects of stroke on neuroimaging and/or motor parameters are found in the first two subgroups of mice that undergo experimental stroke (see appendix 1), we will not continue with the remainder of appendix 1 or appendix 2 ('go/no go' point).

As soon as (early) stroke-related changes in neuroimaging and/or motor or behavioural parameters are found in component 1 ('go/no go' point), we may start with component 2 in which we hypothesize that:

2. Treating mixed dementia with a [REDACTED] diet acutely improves cognition and/or improves brain network integrity in male mice. If these effects of diet are seen in males ('go/no go' point), the same effect will be studied in female AD mice.

3.4.4 List the different types of animal procedures. Use a different appendix 'description animal procedures' for each type of animal procedure.

Serial number	Type of animal procedure
1	Longitudinal effect of stroke and AD on neuroimaging and cognitive parameters
2	Acute effects of [REDACTED] diet on mixed dementia parameters



## 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](http://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 effect of stroke and AD on neuroimaging and cognitive parameters

## 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.

---

With the animal procedures described in this appendix, we aim to investigate the effect of stroke on the structure, function and perfusion of the Alzheimer's disease (AD) brain. To this end we will induce mild experimental stroke in mice transgenic for amyloid precursor protein (APP) (AD mouse model) and wildtype controls and, as a primary outcome parameter, collect neuroimaging data. Imaging the brain is a non-invasive way to assess brain function and structure during life and is therefore the best tool to assess these parameters. Furthermore, as imaging is non-invasive, these techniques can be performed several times in the same animal, allowing for a longitudinal follow-up of individual mice. In our opinion, a longitudinal design better aligns the animal experiment to the different stages of human AD development, increasing the relevance of our study.

A secondary outcome parameter of our study is the cognitive and motor function of AD mice with experimentally induced mild stroke. Both cognition and motor skills are known to be affected by AD and (experimental) stroke and it is therefore relevant to assess a potential cumulative effect of AD and stroke on these parameters. We will select tests that are not too severe for the animals to perform while still relaying relevant data.

Experimental stroke will be induced by transiently occluding the middle cerebral artery (MCAO) in the experimental groups. Before starting the actual experiment, the entire MCAO procedure will be optimized in surplus mice available at the animal facility of [REDACTED]. The neuroimaging procedure will be optimized in a few more surplus mice (that have not been used for MCAO practice). Finally, as gender is an important risk factor of both AD and stroke, we believe it is highly relevant to relate the aforementioned primary and secondary outcome parameters to the sex of the mice. We will therefore use both male and female mice in the actual experiment.

In summary, the general design of the actual experiment is as follows:

1. Measuring physiological parameters and assessing baseline motor skills (coordination tests)
2. Inducing mild experimental stroke by transient MCAO (followed by at least one week of recovery)
3. Motor tests and physiological parameters (1-3 weeks after MCAO)
4. Neuroimaging paradigm (2-4 weeks after MCAO)
5. Repeat of neuroimaging paradigm (one or two times, with several months between paradigms)
6. Behavioral and motor tests (several months after MCAO)
7. Final neuroimaging paradigm and sacrifice (6-8 months after MCAO)

For practical reasons, a maximum of 40 animals can be handled at one time when inducing experimental stroke. Therefore, the total number of mice needed to obtain statistically relevant data will be subdivided in at least four subgroups.

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

---

---

A few weeks before experimental stroke induction, mice are moved to the animal facility where neuroimaging and behavioural tests will be performed (PRIME) and acclimatized for at least one week. As motor skills will be affected by stroke induction, 2-4 simple motor tests will be performed prior to stroke induction (assess baseline motor skills). We will choose tests that are relatively undemanding for the mice (e.g. Pole test, Corner test and Grip test) and have been performed in previous studies assessing the motoric consequences of MCAO. Right before experimental stroke induction, baseline physiological parameters (body weight etc.) will be registered to monitor the health of the animals. As we expect blood pressure (BP) to be affected by both AD pathology and stroke, we will measure BP as an additional physiological parameter. We will select a non-invasive way of measuring BP (tail cuff plethysmography). This method will likely require a few days of habituating the mice to the measurement equipment. This habituation will take place one or two weeks before experimental stroke induction. After habituation, BP will be measured at regular time intervals during the entire experiment.

Transient mild experimental stroke, resulting in focal ischemia, will be induced in young adult transgenic AD mice and age-matched wildtype controls (e.g. littermates) by occluding the middle cerebral artery (MCAO) under general, adequate anaesthetics for a maximum of 30 minutes. MCAO is a well-described and robust method to induce experimental stroke in mice [1]. To estimate occlusion success, cerebral blood flow will be monitored during surgery using Laser Doppler Flow. After surgery, all mice are individually housed and allowed to recover for at least one week. After the recovery period, physiological parameters will be carefully monitored and proper analgesia will be given to reduce any discomfort or pain. Furthermore, expected neurological deficits, such as forelimb weakness and circling to the affected side, will be determined and the aforementioned motor tests (e.g. Pole test, Corner test, Grip test) will be performed to assess the success of the MCAO. A separate group of AD and wildtype mice will receive a sham operation, undergoing similar anaesthetics and surgery but not the actual MCAO (i.e. reduction in blood flow). Sham-operated animals will, among other things, allow us to better assess the effects of stroke on cognition in both wildtype and AD mice.

Two to four weeks after the recovery period, a first set of non-invasive neuroimaging experiments will be performed to measure parameters such as lesion size (diffusion weighted imaging; DWI), neuronal connectivity (resting state functional magnetic resonance imaging; RS-fMRI) and cerebral blood flow (arterial spin labelling; ASL). For neuroimaging, mice are anaesthetised using isoflurane via inhalation. During the neuroimaging experiments, physiological parameters such as heart rate and body temperature are closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with a warm air flow. The entire neuroimaging paradigm (e.g. RS-fMRI, DWI, ASL) will take a maximum of 2 hours per mouse, after which mice are allowed to awake and recover. The paradigm will be repeated one or two more times with a (regular) time interval of several months.

Six to eight months after MCAO, potential cognitive deficits and motor abnormalities will be assessed in the aforementioned motor tests (e.g. Pole test, Corner test and Grip test) and behavioural tests such as Open field and the Barnes or Morris water maze. Similar behavioural tests have been performed in previous studies exploring the effects of ischemia in AD mouse models and will therefore allow for a comparison of our study with these previous studies. In total, these motor and behavioural tests may take up to two weeks to perform. A few days after the last behavioural test has been performed, the aforementioned neuroimaging paradigm will be performed one last time for each mouse (6-8 months after MCAO). Immediately after these scans, mice will be sacrificed without arousal from the anaesthesia.

It should be mentioned that, supervised by experienced technicians/researchers from inside and outside [REDACTED] all involved researchers/technicians will practice experimental occlusion on surplus wildtype mice to optimize the success rate of the

occlusion in the actual experiment. As positioning the mice in the scanner and operating the scanner requires some skill, the neuroimaging procedures will also be optimized before the start of the actual experiments. This optimization should minimize stress for the animals used during the actual neuroimaging experiments.

#### References

1. Macrae, I.M., *Preclinical stroke research--advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia*. Br J Pharmacol, 2011. **164**(4): p. 1062-78.

---

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

---

G\*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ( $P < 0.05$ ; Power: 0.80). To estimate effect size (d), comparable studies previously performed by us and described in literature are explored. Furthermore, the protocol and tools for MCAO will be carefully chosen to increase reproducibility of lesion size, thus decreasing the standard deviation between individual mice and minimizing the number of animals needed. Finally, randomly assigning mice to the sham and MCAO groups and treating and housing both groups similarly, should also contribute to minimizing group sizes.

MCAO will be practiced on surplus mice before the actual experiment takes place, to ensure MCAO is successful in as much of the requested mice as possible during the actual experiment. With a separate set of surplus animals the neuroimaging procedure will be practiced to ensure experienced handling of the mice during the actual neuroimaging procedures.

#### B. The animals

---

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

---

Species: For several reasons, we will use mice (*Mus musculus*) for our project. Not only is AD mostly modeled in mice, stroke induction is also well-validated in this species. Furthermore, on a more practical note, [REDACTED] we will use for neuroimaging is only accessible to mice. We are highly experienced working with mice and AD mouse models in particular.

Origin: 'B2. In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen'

Estimated numbers: Based on the power analysis and taking the expected mortality rates of MCAO and Sham in wildtype (~35% and ~0% resp.) and AD mice (~60% and ~10% resp.) into account, we expect to need about 180 mice (90 male and 90 female, 40% wildtype and 60% AD mice) for the actual experiment. Mortality rates are based on previous experiments (e.g. [1]) and may be the result of unpredictable side-effects of MCAO (e.g. hemorrhage) and/or, in case of seizure-prone AD mice [2], prolonged seizing. With this total number of mice, we expect to ultimately, after MCAO-related mortality, end up with the required number of mice to obtain statistically relevant data ( $n = 14-15$  per experimental group). Both male

and female mice will be divided into the following experimental groups: wildtype-Sham, AD-Sham, wildtype-MCAO and AD-MCAO. We furthermore expect to need about 50 surplus wildtype mice to optimize MCAO and neuroimaging.

**Life stages:** The level of AD pathology, rather than aging, is leading in choosing the suitable life stage of the mice. For the experiment described in this appendix, we will induce mild experimental stroke in young adult mice that have a minimal amount of AD pathology (representing early stage of AD). This will allow us to longitudinally monitor stroke-related effects on AD pathology development, thus aligning this animal experiment to different stages of human AD development. Mice will be sacrificed when they are mature adult mice (representing advanced stage of AD).

1. Kemppainen, S., et al., *Behavioral and neuropathological consequences of transient global ischemia in APP/PS1 Alzheimer model mice*. Behav Brain Res, 2014. **275**: p. 15-26.
2. Minkeviciene, R., et al., *Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy*. J Neurosci, 2009. **29**(11): p. 3453-62.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mouse	'B2. In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen'	230	young adult

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

**Replacement:** To study the complex interaction of both stroke and AD on brain structure and function, it is not possible to use relatively simple animals or *in vitro* models. We have chosen mice as these animals are 1) the most commonly used to model the pathology of AD (i.e. amyloid deposition) and 2) they are, with rats, the only animals where MCAO is performed to experimentally induce stroke. Finally, using mice allows us to study stroke and AD-related behavioural and neurological deficits, parameters that cannot be studied *in vitro*, but are highly relevant when translating findings to human studies.

**Reduction:** This experiment cannot be performed with less animals, as the chosen numbers have been carefully calculated to obtain statistically relevant results while taking a high expected mortality rate, as a result of the MCAO and the development of AD, into account. Furthermore, as previously mentioned, the protocol and tools for MCAO will be carefully chosen to increase reproducibility of lesion size, thus decreasing the standard deviation between individual mice and minimizing the number of animals needed. We will further minimize the number of mice needed by choosing a longitudinal rather than a cross-sectional study design. Mortality rates will be kept as low as possible by optimizing MCAO and neuroimaging with wildtype surplus mice before starting the experiment described in this appendix.

**Refinement:** There are currently no other techniques available to model ischemic stroke with less discomfort to the mice than the MCAO technique we will use. However, several measures will be taken to minimize pain and distress of the animals. For example, mild experimental stroke will be induced using standard operating methods and under general anesthetics. We will furthermore use a relatively non-invasive method of MCAO (e.g. no opening of the skull) and use occlusion tools that insure high reproducibility of the lesion size in different mice. To optimize the success rate, mild experimental stroke induction will furthermore be optimized and/or performed in close collaboration with expert researchers in the field. Neuroimaging experiments will also be optimized and performed under anaesthesia to minimize distress. The least stressful behavioural and neurological tests (based on literature) will be chosen. When possible, mice will be habituated to tools and procedures to further minimize stress levels. Finally, it should be mentioned that mice will receive ample time to recover from the most distressing procedures before a new stressful procedure is started.

---

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

---

To minimize animal suffering, pain and fear the most distressing and painful procedures will be performed by experienced technicians/researchers. Furthermore, general anaesthesia and optimal post-surgery care, including analgesia, will be given. Only after a suitable recovery period will further animal procedures be performed. When possible, mice will be habituated to any tools or procedures that may be considered stressful to the animals, including certain behavioural setups (e.g. Pole test, Open field) and the measurement of blood pressure.

## 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 (not legally required)

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

---

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

No

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

After the occlusion, the animals will be individually housed to optimize healing of the surgical wound and better monitor physiological parameters (food intake etc.) and stroke-related abnormalities (e.g. abnormal motor function). Female mice in particular will experience discomfort as a result of the individual housing (severity: mild). If the mice do not demonstrate aggressive behavior (e.g. biting etc), after the recovery period they will again be group-housed.

### G. Location where the animals procedures are performed

---

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

---

## H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

To relieve the pain associated with the surgery, analgesia will be given just before starting the surgery and, depending on the observed discomfort of the animals, up to 7 days after experimental stroke induction. To select proper analgesia, veterinarians and animal technicians will be consulted.

## I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

All mice will experience (mild) discomfort from stressors (e.g. handling, individual housing, motor and behavioral testing) associated with the different experiments outlined in section 2A (general design). Furthermore, despite proper post-operative care and the relative mild nature of the stroke induced, several adverse effects of the experimental stroke are to be expected. For example, stroke induction will result in neurological deficits, such as forelimb weakness and incessant circling to the affected side. In AD mice these neurological deficits may be more severe. Furthermore, modelling AD in mice often makes these animals more sensitive to (the aforementioned) stressors, resulting in side-effects such as seizures [1]. Inducing stroke in these models is expected to increase these adverse (stress-related) side-effects. These side-effects in turn are expected to increase mortality rates, especially in stroke-induced AD mice. Finally, adverse effects of the anaesthetics, e.g. isoflurane, may also be expected. These may include respiratory depression and a decrease in blood pressure.

1. Minkeviciene, R., et al., *Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy*. J Neurosci, 2009. **29**(11): p. 3453-62.

Explain why these effects may emerge.

Modelling AD in mice often results in increased sensitivity to stress due to the pathological accumulation of amyloid in the brains of these mice. Induction of experimental stroke can be considered stressful and will furthermore impair a part of the brain due to ischemia, thus resulting in neurological and/or behavioural deficits. Combining both pathologies in AD mice is expected to increase the vulnerability of these mice in particular.

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



---

To minimize (stress-related) adverse side-effects and mortality, we have chosen an MCAO technique that is relatively non-invasive (no opening of the skull). Furthermore, both MCAO and neuroimaging will be practiced and the least stressful behavioural and neurological tests (based on literature) will be chosen. When possible, mice will be habituated to tools and procedures. Our extensive experience with AD mouse models should further minimize any stress resulting from for example housing conditions or handling. During anaesthesia, heart rate and body temperature will be closely monitored and supported. If any detrimental effects of anaesthesia are observed, the level of anaesthesia will be rapidly adjusted. When necessary, humane endpoint sacrifices will be performed.

---

## **J. Humane endpoints**

---

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

No > Continue with question K.

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

---

The animals will be prematurely euthanized if during MCAO surgery a decrease in regional cerebral blood flow (rCBF) of >80% of baseline is not reached (Note that a rCBF decrease of >80% during surgery is indicative of successful stroke induction). During the recovery period humane endpoints will be reached when 1) the animal stops eating or drinking, 2) body weight drops over 15% in two days or decreases >20% from its initial weight, 3) severe circulatory or breathing problems occur and/or 4) severe and persistent wound bleeding or infection occurs. Abnormal behavior and motor skills are to be expected, but if 35 days after MCAO surgery animals show only 50% motor activity, they will be euthanized.

---

Indicate the likely incidence.

---

Estimated likely incidence of humane endpoints:

- Euthanization when rCBF reduction of >80% is not reached: 5% (MCAO groups)
- Euthanization during recovery period: 0-5% (highest incidence expected with MCAO, lowest with Sham)

Thus, 5-10% of the total expected mortality rates (Sham: 0% in wild-types, 10% in AD mice; MCAO: 35% in wild-types, 60% in AD mice) can be explained by humane endpoints, the remainder may be attributed to unpredictable side-effects of MCAO (e.g. hemorrhage; 25%) and/or AD pathology (5-25%).

---

## **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 ).

---

---

Practicing the experimental stroke procedure (under anaesthesia) is classified as non-recovery. During the actual experiment, the level of discomfort associated with inducing mild experimental stroke under anaesthesia with recovery can be classified as moderate. This procedure is imperative to the design of the study and therefore cannot be avoided. Each neuroimaging paradigm (under anaesthesia) can be considered mildly discomforting as are all the individual behavioural and coordination tests. To assess general health, several mildly discomforting procedures (handling, weighing etc) will to be performed. Half of the mice will model AD by depositing amyloid protein in their brain, a pathology than gives these mice additional mild discomfort mainly due to the mild epileptic seizures that are associated with the stress-sensitivity of AD mice. We expect these seizures, that will mostly be so small that they are hardly discernable, to occur in >50% of AD mice. The induction of mild stroke is expected to exacerbate the discomfort associated with AD pathology by for example prolonging seizure duration and/or increasing the number of small seizures. Discomfort due to AD pathology in stroke-induced AD mice is therefore expected to be moderate.

Combining the above-mentioned discomfort levels and taking the duration of the experiment into account, we expect the overall level of discomfort to be classified as 'moderate' (all wildtype mice and sham-operated AD mice; 60%) and 'severe' (AD mice with MCAO; 40%). Mice will be given ample time to recover from each moderate procedure before undergoing another procedure at this level of discomfort. The final neuroimaging paradigm will be non-recovery (terminal under anaesthesia).

## 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.

---

Immediately after the last neuroimaging paradigm the mice will be sacrificed to study stroke lesion size, amyloid beta deposition and other relevant molecular markers (e.g. inflammation) in the brains of these mice.

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](http://www.zbo-ccd.nl).
- Or contact us by phone. (0900-2800028).

## 1 General information

1.1	Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.	10300				
1.2	Provide the name of the licenced establishment.	Stichting Katholieke Universiteit Nijmegen				
1.3	List the different types of animal procedures. Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="622 850 815 874">Serial number</th> <th data-bbox="1352 850 1697 874">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="622 882 640 906">2</td> <td data-bbox="1352 882 1951 938">Acute effects of [REDACTED] diet on mixed dementia parameters</td> </tr> </tbody> </table>	Serial number	Type of animal procedure	2	Acute effects of [REDACTED] diet on mixed dementia parameters
Serial number	Type of animal procedure					
2	Acute effects of [REDACTED] diet on mixed dementia parameters					

## 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.

---

With the animal procedures described in this appendix, we aim to investigate the acute effect of treatment with a [REDACTED] diet on mixed dementia cognitive impairment and neuroimaging parameters. Due to the large number of variables that will be addressed in the animal procedures described in this appendix (e.g. stroke, AD, diet, neuroimaging, cognition etc.), we have decided not to use both sexes simultaneously in this component of our project. We will first perform the experiment described in this appendix using male mice. When we see beneficial effects in males, we will also perform the experiment in female mice.

The set-up of the proposed animal procedures will be similar to an as yet unpublished experiment performed by us using wildtype mice (+experimental stroke, [REDACTED] diet). Male mice were used in this previous study, therefore to make comparisons we will also start the current experiment with males. We will induce mild experimental stroke (MCAO) in mice transgenic for amyloid precursor protein (APP)(AD mouse model) and wildtype controls and then feed half of the mice with a [REDACTED] diet containing ingredients such as specific phospholipids and vitamins that may contribute to brain repair. The other half of the mice will be fed a control diet (similar to standard rodent chow) with similar caloric values (isocaloric) as the [REDACTED] diet.

As a primary outcome parameter, we will collect behavioural data. Not only are cognition and motor skills known to be affected by both AD and (experimental) stroke, these skills can be attenuated by dietary intervention. It remains to be investigated what effect a [REDACTED] diet has on mixed dementia. To evaluate behavioural parameters, such as learning and memory, many well-described and highly recognized cognitive tests are available for mice.

As a secondary outcome parameter of these animal procedures, neuroimaging data will be collected to determine if a [REDACTED] treatment can enhance brain network recovery and brain circulation. Imaging the brain is a non-invasive way to assess brain function and structure during life and is therefore the best tool to assess these parameters. Collecting neuroimaging data will furthermore allow for a comparison with the mice used in the animal procedures described in appendix 1.

In summary, the general design of the actual experiment is as follows:

1. Measuring physiological parameters and assessing baseline motor skills (coordination tests)
2. Behavioural experiment measuring baseline cognition
3. Inducing mild experimental stroke by transient MCAO and switching to a [REDACTED] or isocaloric control diet (followed by at least one week of recovery)
4. Coordination tests and physiological parameters (immediately after recovery)
5. Neuroimaging paradigm (about two weeks after MCAO)
6. Behavioural and coordination tests (about 1½ months after neuroimaging)

## 7. Neuroimaging paradigm and sacrifice (about 2 months after MCAO)

For practical reasons, a maximum of 25 animals can be handled at one time in the behavioural experiment measuring baseline cognition. Therefore, the total number of mice needed to obtain statistically relevant data will be subdivided in at least three subgroups per sex.

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

---

We will first perform these experiments in male mice. When effects are found in males, the same experiment will also be performed in female mice.

A few weeks before experimental stroke induction, mice are moved to the animal facility where behavioural tests and neuroimaging will be performed [redacted] and acclimatized for at least one week. At this time, mice will be fed with control diet (similar to regular rodent chow). As motor skills will be affected by stroke induction, 2-4 motor tests will be performed prior to stroke induction (assess baseline motor skills). We will choose tests similar to the ones performed in appendix 1 (e.g. Pole test, Corner test and Grip test) as well as one or two more strenuous motor tests that have been performed in previous MCAO studies (e.g. Rotarod). One cognition test, such as the Barnes or Morris water maze, will be performed in one of the weeks prior to stroke induction to assess baseline cognition (learning/memory). Furthermore, right before experimental stroke induction, baseline physiological parameters (e.g. body weight etc.) will be registered to monitor the health of the animals.

Transient mild experimental stroke, resulting in focal ischemia, will be induced in mature transgenic AD mice and age-matched wildtype controls (e.g. littermates) by occluding the middle cerebral artery (MCAO) under general, adequate anaesthetics for a maximum of 30 minutes. MCAO is a well-described and robust technique to induce experimental stroke in mice [1]. To estimate occlusion success, cerebral blood flow will be monitored during surgery using Laser Doppler Flow. After surgery, all mice are individually housed and half of the mice will be switched from a control diet to a [redacted] diet while the other half remains on the (isocaloric) control diet (similar to regular rodent chow). The animals will be kept on these diets for the remainder of the experiments. Mice are allowed to recover from the MCAO for at least one week. During the recovery period, physiological parameters will be carefully monitored and proper analgesia will be given to reduce any discomfort or pain. Immediately after the recovery period, expected neurological deficits, such as forelimb weakness and circling to the affected side, will be determined and the aforementioned motor tests (e.g. Rotarod, Pole test, etc) will be performed to assess the success of the MCAO.

About two weeks after the MCAO, neuroimaging experiments will be performed to measure parameters such as lesion size (diffusion weighted imaging; DWI), neuronal connectivity ([redacted]) and cerebral blood flow (arterial spin labelling; ASL). For neuroimaging, mice are anaesthetised using isoflurane via inhalation. During the neuroimaging experiments, physiological parameters such as heart rate and body temperature are closely monitored and supported. Temperature is maintained at 37°C with a warm air flow. The entire neuroimaging paradigm ([redacted]) will take a maximum of 2 hours per mouse, after which mice are allowed to awake and recover.

Two to four weeks after neuroimaging, potential motor abnormalities and behavioural and cognitive deficits will be assessed in the aforementioned motor tests (e.g. Rotarod, Pole test and Corner test) and behavioural tests such as open field or the Barnes or Morris water maze. Similar behavioural tests have been performed in previous studies exploring the effects of ischemia in AD mouse models. We have also performed such tests in our previous study exploring the effect of [redacted] diet in wildtype mice with experimental stroke (unpublished data). Therefore, these tests

will allow for a comparison of our study with these previous studies. In total, these tests may take up to two weeks to perform. A few days after the last behavioural test has been performed, the aforementioned neuroimaging paradigm will be performed once more. Immediately after these scans, mice will be sacrificed without arousal from the anaesthesia.

### References

1. Macrae, I.M., *Preclinical stroke research--advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia*. Br J Pharmacol, 2011. **164**(4): p. 1062-78.

---

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

---

G\*Power is used to determine the appropriate sample size for these tests ( $P < 0.05$ ; Power: 0.80). To estimate effect size (d), comparable studies previously performed by us and described in literature are explored. Furthermore, the protocol and tools for MCAO will be carefully chosen to increase reproducibility of lesion size, thus decreasing the standard deviation between individual mice and minimizing the number of animals needed. The composition of the [REDACTED] diet will also be carefully chosen based on previous experiences with these type of diets. To assess the effects of MCAO, we gave chosen to test cognition before and after stroke induction and comparing the brain structure of contra- and ipsilateral sides of the same brain, thus minimizing the number of (control) animals needed. Randomly assigning mice to the control diet and [REDACTED] diet groups and treating and housing both groups similarly, should also contribute to minimizing group sizes.

### B. The animals

---

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

---

Species: For several reasons, we will use mice (*Mus musculus*) for our project. Not only is AD mostly modeled in mice, stroke induction is also well-validated in this species. Furthermore, on a more practical note, the [REDACTED] we will use for neuroimaging is only accessible to mice. We are highly experienced working with mice and have studied the effects of [REDACTED] diet in mice before, allowing for comparisons with these previous mouse studies.

Origin: 'B2. In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen'

**Estimated numbers:** Based on the power analysis and taking the expected mortality rates with MCAO in wildtype (~35%) and AD mice (~60%) into account, we expect to need at least 120 mice (males only) and a maximum of 240 mice (males and females) (40% wildtype and 60% AD mice; 50% on control diet and 50% on [REDACTED] diet) for the experiment. Mortality rates are based on previous experiments (e.g. [1]) and may be the result of unpredictable side-effects of MCAO (e.g. hemorrhage) and/or, in case of seizure-prone AD mice [2], prolonged seizing. We will start the experiment with 120 male mice and optionally also perform it with 120 more female mice. With this total number of mice we expect to ultimately, after MCAO-related mortality, end up with the required number of mice to obtain statistically relevant data in both sexes (n 14-15 per experimental group).

**Life stages:** The level of AD pathology, rather than aging, is leading in choosing the suitable life stage of the mice. For the experiment described in this appendix, we will induce mild experimental stroke in mature adult mice with AD pathology, as these mice have AD-associated impairments (representing advanced stage of AD), thus allowing us to monitor dietary effects on both AD- and stroke-related (cognitive) impairment.

1. Kemppainen, S., et al., *Behavioral and neuropathological consequences of transient global ischemia in APP/PS1 Alzheimer model mice*. Behav Brain Res, 2014. **275**: p. 15-26.

2. Minkeviciene, R., et al., *Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy*. J Neurosci, 2009. **29**(11): p. 3453-62.

Species	Origin	Maximum number of animals	Life stage
mouse	'B2. In een geregistreerd fok- of afleveringsbedrijf in de EU, inclusief Nederland, geen apen'	240	mature adult

**C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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



## **D. Replacement, reduction, refinement**

---

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

---

**Replacement:** To study the complex interaction of both stroke and AD on brain structure and function and study the effect of diet on these parameters and cognition, it is not possible to use relatively simple animals or *in vitro* models. We have chosen mice as these animals are 1) the most commonly used to model the pathology of AD (i.e. amyloid deposition) and 2) they are, with rats, the only animals where MCAO is performed to experimentally induce stroke. Mice furthermore allow us to study stroke and AD-related behavioural and neurological deficits and the effect of diet on these parameters, parameters that cannot be studied *in vitro*.

**Reduction:** This experiment cannot be performed with less animals, as the chosen numbers have been carefully calculated to obtain statistically relevant results while taking a high expected mortality rate, as a result of the MCAO and the development of AD, into account. Furthermore, as previously mentioned, the protocol and tools for MCAO will be carefully chosen to increase reproducibility of lesion size, thus decreasing the standard deviation between individual mice and minimizing the number of animals needed. The experience gained from performing MCAO and neuroimaging in appendix 1 should also lower mortality rates in this experiment. The composition of the [REDACTED] diet will also be carefully chosen based on our previous experiences with these types of diets.

**Refinement:** There are currently no other techniques available to model ischemic stroke with less discomfort to the mice than the MCAO technique we will use. However, several measures will be taken to minimize pain and distress of the animals. For example, experimental stroke will be induced using standard operating methods and under general anesthetics. We will furthermore use a relatively non-invasive method of MCAO (e.g. no opening of the skull) and use occlusion tools that insure high reproducibility of the lesion size in different mice. To optimize the success rate, mild experimental stroke induction will furthermore be performed in close collaboration with expert researchers in the field. Neuroimaging experiments will also be performed under anaesthesia to minimize distress and the least stressful behavioural and neurological tests (based on literature) will be chosen. When possible, mice will be habituated to tools and procedures to further minimize stress levels. Based on previous experiments, we do not expect any discomfort as a result of the [REDACTED] diet.

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

---

To minimize animal suffering, pain and fear the most distressing and painful procedures will be performed by experienced technicians/researchers. Furthermore, general anaesthesia and optimal post-surgery care, including analgesia, will be given. Only after a suitable recovery period will further animal procedures be performed. When possible, mice will be habituated to any tools or procedures that may be considered stressful to the animals, including certain behavioural setups (e.g. Pole test, Open field).

# 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 (not legally required)

# Accommodation and care

## F. Accommodation and care

---

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

---

No

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

---

After the occlusion, the animals will be individually housed to optimize healing of the surgical wound and better monitor physiological parameters and stroke-related abnormalities (e.g. abnormal motor function). As individual housing is also necessary to accurately measure consumption of the diet by each mouse, mice will not be group-housed after the recovery period (unlike appendix 1). Female mice in particular will experience discomfort as a result of the individual housing (severity: mild).

## 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.

---

To relieve the pain associated with the surgery, analgesia will be given just before starting the surgery and, depending on the observed discomfort of the animals, up to 7 days after experimental stroke induction. To select proper analgesia, veterinarians and animal technicians will be consulted.

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

---

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

---

All mice will experience (mild) discomfort from stressors (e.g. handling, individual housing, motor and behavioral testing) associated with the different experiments outlined in section 2A (general design). Furthermore, despite proper post-operative care and the relative mild nature of the stroke induced, several adverse effects of the experimental stroke are to be expected. For example, stroke induction will result in neurological deficits, such as forelimb weakness and incessant circling to the affected side. In AD mice these neurological deficits may be more severe. Furthermore, modelling AD in mice often makes these animals more sensitive to (the aforementioned) stressors, resulting in side-effects such as seizures [1]. Inducing stroke in these models is expected to increase these adverse (stress-related) side-effects. These side-effects in turn are expected to increase mortality rates. Finally, adverse effects of the anaesthetics, e.g. isoflurane, may also be expected. These may include respiratory depression and a decrease in blood pressure.

1. Minkeviciene, R., et al., *Amyloid beta-induced neuronal hyperexcitability triggers progressive epilepsy*. J Neurosci, 2009. **29**(11): p. 3453-62.

Explain why these effects may emerge.

---

Modelling AD in mice often results in increased sensitivity to stress due to the pathological accumulation of amyloid in the brains of these mice. Induction of experimental stroke can be considered stressful and will furthermore impair a part of the brain due to ischemia, thus resulting in neurological and/or behavioural deficits. Combining both pathologies in AD mice is expected to increase the vulnerability of these mice in particular.

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

---

To minimize (stress-related) adverse side-effects and mortality, we have chosen an MCAO technique that is relatively non-invasive (no opening of the skull). As a result of the experiments of appendix 1, we will be experienced in performing both MCAO and neuroimaging. Our extensive experience with AD mouse models should further minimize any stress resulting from for example housing conditions or handling. When possible, mice will be habituated to tools and procedures. During anaesthesia, heart rate and body temperature will be closely monitored and supported. If any detrimental effects of anaesthesia are observed, the level of anaesthesia will be rapidly adjusted. When necessary, humane endpoint sacrifices will be performed.

## **J. Humane endpoints**

---

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

---

No > Continue with question K.

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

---

The animals will be prematurely euthanized if during MCAO surgery a decrease in regional cerebral blood flow (rCBF) of >80% of baseline is not reached (Note that a rCBF decrease of >80% during surgery is indicative of successful stroke induction). During the recovery period humane endpoints will be reached when 1) the animal stops eating or drinking, 2) body weight drops over 15% in two days or decreases >20% from its initial weight, 3) severe circulatory or breathing problems occur and/or 4) severe and persistent wound bleeding or infection occurs. Abnormal behavior and motor skills are to be expected, but if 35 days after MCAO surgery animals show only 50% motor activity, they will be euthanized.

---

Indicate the likely incidence.

---

Estimated likely incidence of humane endpoints:

- Euthanization when rCBF reduction of >80% is not reached: 5%
- Euthanization during recovery period: 0-5%

Thus, 10% of the total expected mortality rates (35% in wild-types, 60% in AD mice) can be explained by humane endpoints, the remainder may be attributed to unpredictable side-effects of MCAO (e.g. hemorrhage; 25%) and/or AD pathology (25%).

## **K. Classification of severity of procedures**

---

---

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

---

During the experiment, the level of discomfort associated with inducing mild experimental stroke under anaesthesia with recovery can be classified as moderate. This procedure is imperative to the design of the study and therefore cannot be avoided. The individual behavioural and coordination tests can be considered mildly discomforting as is the neuroimaging paradigm (under anaesthesia). To assess general health, several mildly discomforting procedures (handling, weighing etc) will to be performed. Half of the mice will model AD by depositing amyloid protein in their brain, a pathology than gives these mice additional discomfort mainly due to the mild epileptic seizures that are associated with the stress-sensitivity of AD mice. The induction of mild stroke is expected to exacerbate the mild discomfort associated with AD pathology (expected in >50% of AD mice) by for example prolonging seizure duration and/or increasing the number of small seizures. Discomfort due to AD pathology in the stroke-induced AD mice is therefore expected to be moderate. Finally, the change of diet can be considered mildly discomforting (50% of mice).

Combining the above-mentioned discomfort levels and taking the duration of the experiment into account, we expect the overall level of discomfort to be classified as 'moderate' for all mice. The final neuroimaging paradigm will be non-recovery (terminal under anaesthesia).

## 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.

---

Immediately after the last neuroimaging paradigm, the mice will be sacrificed to study stroke lesion size, amyloid beta deposition and other relevant molecular markers (e.g. inflammation) in the brains of these mice.

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 2015-0079
2. Titel van het project: Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer's disease.
3. Titel van de NTS: De gevolgen van een herseninfarct op de ziekte van Alzheimer – een dieet interventie en hersenscan studie in muizen.
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:
  - Naam DEC: RUDEC
  - Telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] bereikbaar op maandag, dinsdag, en donderdag van 9:00 tot 15:00 uur
  - Mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject:
  - ontvangen door DEC: 22-05-2015
  - aanvraag compleet
  - in vergadering besproken: 02-06-2015 en 07-07-2015
  - anderszins behandeld
  - termijnonderbreking(en) van 08-06-2015 tot 23-06-2015 en van 13-07-2015 tot 20-07-2015
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen
  - aanpassing aanvraag: 23-06-2015 en 20-07-2015
  - advies aan CCD: 27-08-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden
  - Aanwezige (namens) aanvrager
  - Strekking van de vraag / vragen
  - Strekking van het (de) antwoord(en)
  - Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag
8. Correspondentie met de aanvrager
  - Datum: 08-06-2015
  - Strekking van de vragen:
  - **Project Proposal:**
  - -3.1 De onderzoekers classificeren hun projectaanvraag als translationeel onderzoek. De commissie is niet overtuigd van de validiteit van dit diermodel voor de humane situatie. De strokes bij Alzheimer patiënten zijn kennelijk dermate klein dat zij vaak onopgemerkt blijven, bij de Alzheimer muizen wordt een dermate groot infarct geïnduceerd dat 60% van de dieren

dit niet overleeft. Kunnen de onderzoekers uitleggen waarom zij dit model relevant achten voor Alzheimer patiënten? Is er sprake van face, predictive, content of construct validity ?

- De commissie besluit eerst uw antwoord op deze vraag af te wachten alvorens zij de rest van de projectaanvraag nader bestudeert.
- Datum antwoord: 23-06-2015
- Strekking van het antwoord:
- Wij betreuren het dat onze aanvraag kennelijk niet duidelijk genoeg is geweest, waardoor de relevantie van ons diermodel niet gezien wordt. Wij hopen bij deze meer duidelijkheid te verschaffen op dit punt. Ten eerste erkennen wij dat de door ons geschatte 60% uitval bij de Alzheimer muizen met stroke inderdaad aanzienlijk is. Echter, zoals wij hebben aangegeven in beide appendices, onder andere bij punt B ('estimated numbers'), zal deze hoge mortaliteit bij de Alzheimer muizen in grote mate inherent zijn aan de gevoeligheid van deze muizen voor epileptische aanvallen (zie referentie 2 bij punt B). Wij schatten de uitval als gevolg van deze aanvallen op 25%. Daarbij schatten wij, op basis van onze eigen ervaring met deze techniek, de uitval als gevolg van de inductie van de stroke (door bijv. onverwachte bloedingen), ook op ongeveer 25%. Nog eens 10% van de uitval zal samenhangen met de humane eindpunten. Kortom, opgeteld verwachten wij met name bij de Alzheimer muizen een hoge uitval van 60% die echter niet één op één samenhangt met de grootte van het geïnduceerde infarct. Bovenstaande beschrijving van de door ons geschatte mortaliteitspercentages staat ook vermeld bij punt J ('likely incidence of humane endpoints') van de appendices.

Wat betreft de daadwerkelijke grootte van het door ons te induceren infarct, de experimental stroke die wij willen induceren wordt juist beschouwd als een milde stroke, gezien de korte duur van de occlusie. Gangbare tijdsduur van occlusie is 30 tot 120 minuten (zie referentie 13 in de project proposal), resulterend in modellen voor milde tot ernstige stroke. Wij willen in ons project een occlusie van hooguit 30 minuten toepassen, om zo het ongerief bij onze Alzheimer muizen te beperken en langdurige overleving te bevorderen. Kortom, onze muizen zullen een betrekkelijk klein, maar wel detecteerbaar, infarct krijgen. Om één en ander in de aanvraag te verduidelijken wat betreft ons model, hebben wij nu een korte beschrijving van stroke muismodellen toegevoegd aan punt 3.1 van de project proposal. Bij verwijzingen naar de experimental stroke bij de muizen geven wij nu bovendien aan dat dit een milde stroke betreft van maximaal 30 minuten (en dus niet meer 30-60 minuten, zoals vermeld in de oorspronkelijke aanvraag).

Hoewel bij de ziekte van Alzheimer (cerebro)vasculaire aandoeningen zoals microinfarcts of microbleeds ('small vessel disease') inderdaad een grote rol spelen, hebben wij nooit de indruk willen wekken dat alleen onopgemerkte infarcten een rol spelen bij stroke-gerelateerde Alzheimer. Bij deze vorm van dementie komen namelijk waarneembare infarcten ook zeker voor. Kortom, ook het milde infarct dat wordt geïnduceerd in ons model weerspiegelt wel degelijk een type infarct dat bij patiënten wordt waargenomen. Het is wat ons betreft dan ook zeker een geschikt model om de interactie tussen cerebrovasculaire ziekten en de ziekte van Alzheimer, een mengbeeld dat bij Alzheimer patiënten veelvuldig voorkomt, te onderzoeken. We hebben nu geprobeerd om de rol van waarneembare strokes duidelijker naar voren te laten komen in de aanvraag.

Graag willen wij hier nog benadrukken dat wij gebruik zullen maken van (een combinatie van) goed beschreven en alom gebruikte modellen voor zowel de ziekte van Alzheimer als



stroke. Zo is de occlusie van de middle cerebral artery, zoals wij die willen uitvoeren bij onze muizen, de meest gangbare methode om een model voor humane stroke te creëren. En, hoewel onze vraagstelling uniek is, zijn wij daarbij ook niet de eersten die stroke opwekken bij Alzheimer muizen (zie referenties 14-16 van de project proposal). Al met al menen wij dat er, gezien het feit dat ons model relevante etiologische en pathofysiologische aspecten van de humane condities nabootst, zeker sprake is van face en construct validity.

- Datum: 13-07-2015
- Strekking van de vragen:
- **Description of Animal Procedures:**
- -DAP 1 en 2, onderdeel B: Er is erg veel uitval van dieren, vooral bij de AD muizen. De onderzoekers schrijven dat dit in 25% van de dieren komt door epileptische aanvallen. Kunnen de onderzoekers aangeven wat het ongerief is dat gepaard gaat met de ernstige epileptische aanvallen? Welk percentage van de AD-dieren heeft epileptische aanvallen waar ze niet aan overlijden, en welke mate van ongerief ervaren deze dieren? In welke mate draagt de inductie van de stroke bij aan het optreden van aanvallen? De onderzoekers worden verzocht de inschatting van het ongerief voor de AD-muizen hier uitvoerig toe te lichten en te verwerken bij onderdeel K.
- Datum antwoord: 23-06-2015
- **Description of Animal Procedures, onderdeel B:**
- Zoals was vermeld bij onderdeel J van beide appendices, schatten wij de uitval als gevolg van de AD pathologie (A $\beta$  depositie) bij de transgene muizen mét stroke inderdaad op 25%. Ook in de transgene muizen waar geen stroke wordt geïnduceerd verwachten wij uitval gerelateerd aan AD pathologie, maar deze schatten wij lager in, namelijk op 5-10%. Wij hebben nu dan ook in onderdeel J ('likely incidence') van appendix 1, waarin het gebruik van AD muizen zonder MCAO wordt beschreven, de uitval als gevolg van AD pathologie genuanceerd naar 5-25%. Wij verwachten hierbij inderdaad dat de AD-gerelateerde uitval in de transgene muizen met name het gevolg zal zijn van epileptische aanvallen. Deze aanvallen zijn een bekende bijkomstigheid van de accumulatie van A $\beta$  in AD muismodellen (zie de referentie genoemd bij onderdeel I), waarbij het vermelden waard is dat ook bij de mens het risico op dergelijke aanvallen hoger is bij AD patiënten dan bij gezonde controles. Wat ons betreft draagt de aanwezigheid van epileptische aanvallen bij AD muizen dan ook bij aan de translationele waarde van het model.  
Wat betreft het ongerief geassocieerd met de epileptische aanvallen bij AD muizen, is het onze ervaring dat de aanvallen over het algemeen zeer klein en kortdurend zijn (enkele seconden) en dat de muis hier niet of nauwelijks last van heeft. Wij zouden het ongerief van deze aanvallen in onbehandelde AD muizen dan ook als mild classificeren. Door blootstelling aan stressoren kan een aanval langdurig worden, wat het ongerief van de dieren verhoogt en de dood van de muis tot gevolg kan hebben. Wij verwachten dat dergelijke langdurige epileptische aanvallen meer zullen voorkomen in de AD muizen waarbij een stroke is geïnduceerd, wat maakt dat wij de uitval als gevolg van AD pathologie bij deze dieren zo'n 20% hoger inschatten en het ongerief van de epileptische aanvallen inschatten als 'moderate' in plaats van 'mild'. Deze toelichting is als gevraagd toegevoegd aan onderdeel K. Een inschatting geven van het percentage AD muizen dat een kortdurende of langdurige aanval krijgt, maar daar niet aan overlijdt, is lastig aangezien veel aanvallen onopgemerkt

zullen blijven. Eén en ander zal ook afhangen van het te gebruiken AD muismodel en de leeftijd van de muizen. Zo is onze ervaring met APPswe/PS1dE9 muizen dat zowel het aantal aanvallen als de uitval na een leeftijd van 5 maanden oud sterk afneemt, maar dit zal niet voor elk model gelden. Op basis van eerdere studies, waaronder de studie waarnaar wij refereren bij onderdeel I, verwachten wij dat, ongeacht het gekozen model of de leeftijd, bij >50% van de AD muizen een epileptische aanval kan plaatsvinden. Ook dit gegeven hebben wij toegevoegd aan onderdeel K van de appendices.

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC)

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

**B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. Het project is vergunningplichtig.
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.

**C. Beoordeling (inhoud):**

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie is in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling, namelijk 'to study the effect of stroke on the structure, function and perfusion of the AD brain to a) find novel (sex-specific) neuroimaging markers and/or predictors for mixed dementia and b) further elucidate (sex-specific) pathophysiological mechanisms linking stroke and AD' en 'investigate the effect of a [REDACTED] [REDACTED] diet on stroke- and AD-related cognition and brain network integrity'. Wetenschappelijk is dit onderzoek van belang, omdat het meer inzicht kan verschaffen in de implicaties van een herseninfarct voor hersenstructuur en -functie, cognitie en gedrag voor beide sexen in een muizenmodel voor de ziekte van Alzheimer. Voorts wordt duidelijk of een [REDACTED] [REDACTED] dieet het verloop van de ziekte – al dan niet in combinatie met een herseninfarct - kan beïnvloeden. Dit onderzoek is ook maatschappelijk van belang, omdat de resultaten op termijn kunnen leiden tot de ontwikkeling van (sexe-specifieke) diagnostiek en/of geïndividualiseerde therapie voor mensen met de ziekte van Alzheimer. De ziekte van Alzheimer is een invaliderende ziekte met een toenemende prevalentie in de bevolking. Betere behandelingen zouden resulteren in gezondheidswinst voor veel mensen, en in kostenreductie door het terugdringen van invaliditeit. De realisatie van de genoemde doelstellingen vertegenwoordigt in de ogen van de DEC daarom een substantieel belang.
4. Deze groep heeft veel ervaring in dit onderzoeksveld en met de voorgestelde dierproeven. De DEC heeft uitvoerig stilgestaan bij de vraag of de gebruikte methode voor het aanbrengen van

herseneninfarcten bij de muizen een realistisch model is voor de herseneninfarcten die optreden bij Alzheimer patiënten, en waarvan verondersteld wordt dat ze bijdragen aan het ziektebeeld. De DEC is tot de overtuiging gekomen dat de gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot betrouwbare uitspraken over het effect van een herseneninfarct bij muizen met een genetische aanleg voor de ziekte van Alzheimer en de mogelijke therapeutische werking van een XXXXXXXXXX dieet.

5. Er is geen sprake van bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren.
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Het ongerief wordt hoofdzakelijk veroorzaakt door het induceren van een herseneninfarct, en de gevolgen daarvan voor de dieren in de daarop volgende maanden. De combinatie met een genetische aanleg voor de Ziekte van Alzheimer verergert dit ongerief. De commissie heeft extra aandacht besteed aan het achterhalen van het werkelijke ongerief voor de muizen met een genetische aanleg voor de ziekte van Alzheimer en de invloed van die genetische aanleg op de impact van een herseneninfarct, om er zeker van te zijn dat dit onderzoek ethisch verantwoord is. De DEC schat het ongerief als gevolg van de benodigde operatie in als matig. Het ongerief als gevolg van de gedragstesten en het imageren schat de commissie in als licht. Het ongerief voor de dieren met een genetische aanleg voor de Ziekte van Alzheimer die na het herseneninfarct gedurende lange tijd (6 tot 8 maanden) in het experiment blijven, schat de commissie in als ernstig. Het cumulatief ongerief voor de muizen in de beschreven vergunningaanvraag is daarom terecht ingeschat als matig voor 80% van de dieren, en ernstig voor 20% van de dieren.
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**. De doelstelling van het project kan niet gerealiseerd worden zonder proefdieren of door gebruik van minder complexe diersoorten. Om het effect van herseneninfarcten op cognitie en gedrag te kunnen meten zijn proefdieren nodig die een voldoende complex gedragsrepertoire hebben.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat en proportioneel ten opzichte van de gekozen strategie en de looptijd. De uitval, met name onder de dieren met een genetische aanleg voor de Ziekte van Alzheimer waarbij een herseneninfarct wordt aangebracht, is in de loop van het experiment vrij hoog. Het betreft een lastige ingreep die niet altijd lukt. Ook is het van belang om in het traject na de ingreep strikte humane eindpunten te hanteren en dieren met complicaties op tijd uit de proef te nemen. Voor het grootste deel gaat het bij de dieren die uitvallen niet om dieren met ernstig ongerief. Het uitvalpercentage is gebruikelijk voor dit type model en is niet te wijten aan een gebrek aan technische vaardigheid van de onderzoekers. De DEC is het eens met het beschreven onderzoeksmodel en de onderbouwing van het aantal benodigde dieren, waarbij rekening wordt gehouden met die uitval. Door de resultaten van de dieetinterventie bij mannelijke dieren af te wachten alvorens dit bij vrouwelijke dieren wordt bepaald, wordt onnodig gebruik van proefdieren voorkomen. De DEC is van oordeel dat het project kan worden uitgevoerd met maximaal 470 muizen.
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven. De experimentele handelingen bij de dieren zullen worden uitgevoerd door hierin getrainde onderzoekers, waardoor de stress voor de dieren zoveel mogelijk wordt beperkt. Het

herseneninfarct wordt op een naar verhouding weinig-invasieve manier en gedurende een zo kort mogelijke tijd aangebracht. De DEC is ervan overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.

Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.

10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project, zelfstandig leesbaar, beknopt en begrijpelijk geformuleerd.

#### **D. Ethische afweging**

Op basis van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende ethische afweging.

Met dit onderzoek worden belangrijke wetenschappelijke inzichten verworven in de implicaties van een herseneninfarct voor hersenstructuur en –functie, cognitie en gedrag voor beide sexen bij een muizenmodel voor de ziekte van Alzheimer. Voorts wordt duidelijk of een [REDACTED] dieet het verloop van de ziekte – al dan niet in combinatie met een herseneninfarct - kan beïnvloeden. Het is aannemelijk dat dit onderzoek op termijn kan bijdragen aan het ontwikkelen van betere diagnostiek en therapie voor mensen met de Ziekte van Alzheimer. Het belang van de genoemde wetenschappelijke inzichten in de rol van herseneninfarcten bij de Ziekte van Alzheimer en van betere diagnostiek en geïndividualiseerde therapie voor mensen met deze ziekte acht de DEC substantieel, mede gezien de toenemende prevalentie van deze invaliderende ziekte.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat de dieren die in dit onderzoek gebruikt zullen worden matig ongerief ondervinden als gevolg van het herseneninfarct. Voor de dieren met een genetische aanleg voor de Ziekte van Alzheimer die gedurende lange tijd gevolgd zullen worden (20% van de dieren) leidt dit tot ernstig ongerief. De commissie heeft extra aandacht besteed aan het achterhalen van het werkelijke ongerief voor de muizen met een genetische aanleg voor de ziekte van Alzheimer, om er zeker van te zijn dat dit onderzoek ethisch verantwoord is. De commissie is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van de vervanging, vermindering en/of verfijning van dierproeven. Het gebruik van de dieren en het daarbij optredende ongerief is onvermijdelijk, wil men de doelstellingen kunnen realiseren. De experimenten komen qua design overeen met wat in het onderzoeksveld gebruikelijk is.

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 onder de volgende voorwaarden
    - o 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
2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



## Centrale Commissie Dierproeven

7

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboudumc  
[Redacted]  
Postbus 9101  
6500 HB Nijmegen

### Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
www.zbo-ccd.nl

T 0900 28 000 28 (10 ct /min)  
info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD103002015234

Datum: 01-09-2015

Factuurdatum: 1 september 2015  
Vervaldatum: 1 oktober 2015  
Factuurnummer: 201570234  
040823-461220  
2015-0079  
[Redacted]

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015234	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

[REDACTED]

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

www.zbo-ccd.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD103002015234

**Bijlagen**

2

Datum 01-09-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 31 augustus 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD103002015234. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling 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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.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

## **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10300  
Naam instelling of organisatie: Radboud Universiteit Nijmegen  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: ██████████  
KvK-nummer: 41055629  
Straat en huisnummer: Geert Groteplein 10  
Postbus: 9101  
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN  
IBAN: NL90ABNA0231209983  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: UMC St. Radboud

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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



Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]  
Naam: [REDACTED]  
Postbus: 9101  
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Nee

Wat mag de gemachtigde doen?

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

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 28 september 2015  
Geplande einddatum: 28 september 2020  
Titel project: Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer  
Titel niet-technische samenvatting: De gevolgen van een herseninfarct op de ziekte van Alzheimer een dieet interventie en  
Naam DEC: RU Dec  
Postadres DEC: Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen [REDACTED]  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Nijmegen  
Datum: 31 augustus 2015

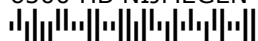


> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD103002015234

**Bijlagen**

2

Datum 01-09-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 1 september 2015

Vervaldatum: 1 oktober 2015

Factuurnummer: 201570234

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD103002015234	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Radboud Universiteit Nijmegen

Postbus 9101

6500 HB NIJMEGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD103002015234

**26 SEP. 2015**

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 31 augustus 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer's disease" met aanvraagnummer AVD103002015234. 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. U kunt met uw project "Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer's disease" starten. De vergunning wordt afgegeven van 28 september 2015 tot en met 27 september 2020. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning voor maximaal 5 jaar kan worden afgegeven. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

#### **Beoordeling achteraf**

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

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie RU Dec gevoegd. Dit advies is opgesteld op 27 augustus 2015. 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. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

### **Bijlagen:**

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

## Projectvergunning

### gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Radboud Universiteit Nijmegen  
Adres: Postbus 9101  
Postcode en plaats: 6500 HB NIJMEGEN  
Deelnemersnummer: 10300

deze projectvergunning voor het tijdvak 28 september 2015 tot en met 27 september 2020, voor het project "Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer's disease" met aanvraagnummer AVD103002015234, volgens advies van Dierexperimentencommissie RU Dec.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is [REDACTED] verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 31 augustus 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 31 augustus 2015;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale Indiening op 31 augustus 2015;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 27 augustus 2015, ontvangen op 31 augustus 2015.

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Longitudinal effect of stroke and AD on neuroimaging and cognitive parameters	Muizen (Mus musculus) / wildtype en AD muizen	230	Ernstig / severe	
Acute effects of multi-nutrient diet on mixed dementia parameters	Muizen (Mus musculus) / wildtype en AD muizen	240	Matig / moderate	

**Voorwaarden****Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod 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 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IVD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

# Weergave wet- en regelgeving

## **Dit project en wijzigingen**

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

Artikel 10b schrijft voor dat het verboden is een dierproef te verrichten die leidt tot ernstige mate van pijn, lijden, angst of blijvende schade die waarschijnlijk langdurig zal zijn en niet kan worden verzacht, tenzij hiervoor door de Minister 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 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. In dit project worden dierproeven toegepast waarbij die vallen in de categorie ernstig volgens artikel 10b van de wet en wordt daarom voorzien van beoordeling achteraf. Deze beoordeling zal uiterlijk december 2020 plaatsvinden. Er zal dan beoordeeld worden of de

doelstellingen van het project werden bereikt. Daarnaast wordt bekeken of de schade die de dieren hebben ondervonden, het aantal en soorten proefdieren en de ernst van lijden van de proevendieren conform de vergunning waren.

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** donderdag 8 oktober 2015 10:59  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** Info-zbo  
**Onderwerp:** Terugkoppeling aanvraag AVD103002015234

Beste DEC,  
Onlangs heeft u een advies uitgebracht aan de CCD betreffende aanvraag AVD103002015234, getiteld: "Elucidating the diagnostic, therapeutic and mechanistic implications of stroke in Alzheimer's disease".

Namens de CCD bedank ik u voor dit heldere, goed onderbouwde advies. De CCD heeft uw advies gevolgd. Het project is vergund. De CCD heeft echter nog 2 algemene voorwaarden toegevoegd.

- 1) De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.
- 2) In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Deze e-mail is enkel bedoeld ter informatie.

Met vriendelijke groet,  
[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl). Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.

Inventaris Wob-verzoek W16-07S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2015235</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel			x					
3	Niet-technische samenvatting			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven			x					
5	DEC-advies				x		x	x	
6	Machtiging				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Verzoek aanvulling				x		x	x	
9	Reactie op aanvulling verzoek				x		x	x	
10	Bijlage beschrijving dierproeven herzien			x					
11	Niet-technische samenvatting herzien	x							
12	Factuur				x		x	x	
13	Advies CCD		x						x
14	Beschikking en vergunning				x		x	x	
15	Mail terugkoppeling DEC 16-10-2015				x		x	x	

17 SEP. 2015



Centrale Commissie Dierproeven

CCD

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

**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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl) of in de toelichting op de website.
- Of bel met 0900-2800028 (10 ct/min).

**1 Gegevens aanvrager**

1.1 Heeft u een deelnemernummer van de NVWA?  
*Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.*

Ja > Vul uw deelnemernummer in 50100  
 Nee > U kunt geen aanvraag doen

---

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

Naam instelling of organisatie TNO  
Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde [Redacted]  
KvK-nummer 27376655  
Straat en huisnummer  
Postbus 96800  
Postcode en plaats 2509 JE DEN HAAG  
IBAN NL39INGB0657819271  
Tenaamstelling van het rekeningnummer TNO

---

1.3 Vul de gegevens van het postadres in.  
*Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.*

---

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

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

---

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

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

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  
 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 - 11 - 2015

Einddatum 31 - 10 - 2020

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Bevorderen respiratoire gezondheid van vleeskalveren

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

Bevorderen respiratoire gezondheid van vleeskalveren

- 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 € 748 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
 Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur o.v.v. order nummer **3100117448/1**

## 5 Checklist bijlagen

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


## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam   
 Functie   
 Plaats Den Haag  
 Datum 1 - 09 - 2015  
 Handtekening 

15/9/2015







## 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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.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.

Jonge zoogdieren zijn erg gevoelig voor luchtweginfecties in het eerste levensjaar door een nog niet volledig werkend immuunsysteem. Deze luchtweginfecties kunnen leiden tot ziekte en sterfte. Ook jonge kalveren hebben veel last van luchtweginfecties, een probleem dat op dit moment wordt aangepakt middels gebruik van antibiotica. De micro-organismen, die grotendeels verantwoordelijk zijn voor deze luchtweginfecties, zijn veelal afkomstig uit de nasopharyngeale omgeving (dit is de omgeving van de neus dichtbij de keel) waar ze onder gezonde omstandigheden onderdeel vormen van de complexe microbiële gemeenschap, de nasopharyngeale microbiota, ook wel nasopharygeaal microbioom genoemd. De algehele rol van microbiota in de humane gezondheid is divers: microbiota zijn betrokken bij kolonisatieresistentie tegen pathogenen, zijn belangrijk bij de maturatie en aanpassing van het immuunsysteem en zorgen voor essentiële metabolische omzettingen.

In een gezond nasopharygeaal microbioom krijgen de opportunistische pathogenen die onderdeel vormen van het microbioom, geen kans om uit te groeien en daardoor luchtweginfecties te veroorzaken. Een gezonde samenstelling van het microbioom, met name het microbioom van de luchtwegen is daarom van groot belang voor de gezondheid.

In babies wijzen recente ontwikkelingen op significante correlaties tussen de voeding en de samenstelling van hun microbioom, zowel in de darm als in de luchtwegen. In een eerdere studie met vleeskalveren is gebleken dat het nasopharygeaal microbioom van jonge vleeskalveren gedurende de eerste 12 weken op het mestbedrijf behoorlijk onderhevig is aan veranderingen. Deze dynamiek suggereert dat het mogelijk zou moeten zijn om het nasopharygeaal microbioom (positief) te beïnvloeden. Dit project is daarom gericht om te onderzoeken of positieve beïnvloeding van het nasopharygeaal microbioom (de bacteriële samenstelling van de neusholte dichtbij de keel) bij kalveren middels dieet interventie en het toedienen van neussprays, kan leiden tot vermindering van luchtwegaandoeningen en daarmee tot verbetering van de algehele gezondheid van de kalveren.

Een bijkomend maar groot voordeel van het verbeteren van kalvergezondheid, is de daarmee gepaard gaande vermindering van het gebruik van antibiotica om zieke dieren te behandelen. Antibioticum gebruik in de dierhouderij (en dus ook de kalverhouderij) kan leiden tot een toename van resistente, pathogene bacteriën zoals bijv. MRSA en ESBL bacteriën. Dit is een groot gevaar voor de volksgezondheid en vanuit het ministerie is vermindering van het antibioticum gebruik in de veehouderij daarom een speerpunt. Het verbeteren van de gezondheid van vleeskalveren door voedingsinterventies is hiervoor een zeer aantrekkelijke methode.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

De algehele doelstelling van dit project is het onderzoeken of met behulp van voedsel interventies, het mogelijk is om de nasopharygeale microbioom

samenstelling positief te beïnvloeden in vleeskalveren en zo een positief effect op het onderdrukken van luchtweginfecties te bewerkstelligen. In dit project is gekozen voor jonge vleeskalveren als proefdieren omdat dit een kwetsbare groep voor luchtweginfecties is.

Deze studie maakt gebruik van groepen van reguliere vleeskalveren die gehuisvest worden in een regulier vleeskalveren bedrijf en verschillende voersamenstellingen te eten krijgen. De uitlezing van het effect van de voedingsinterventie zal plaats vinden op algeheel niveau: hoeveel luchtweginfecties ontwikkelen de kalveren in de verschillende groepen en wat is de algemene staat van gezondheid? Daarnaast zal de microbiom samenstelling van de nasopharynx worden gemonitord door middel van het sequensen van het DNA uit de nasopharynx swabs van de kalveren. Tevens zullen fecale swabs worden geanalyseerd om ook daarvan de microbiële samenstelling te bepalen om te onderzoeken of er een verband is tussen het nasopharyngeaal en het fecaal microbiom en algehele gezondheid.

Het nemen van nasopharynx swabs is een goed lopende procedure door bevoegd en goed opgeleid personeel met veel ervaring op dit gebied waarbij de dieren zeer weinig ongerief ervaren. Het nemen van rectale swabs is een nog veel simpeler handeling die vrijwel geen ongemak voor de dieren oplevert. De nasopharyngeale en rectale swabs zullen -indien mogelijk- worden genomen op het moment dat de standaardmetingen zoals gebruikelijk voor vleeskalveren in de industrie ook worden verricht (wegingen, Hb-meting en serum Fe-meting). De daaropvolgende handelingen van DNA extractie en microbiom analyse door middel van 16S amplicon sequencing zijn bewezen methodes die al vele malen succesvol zijn toegepast binnen onze instelling op zeer uiteenlopende samples, waaronder rectale en nasopharyngeale swabs (resultaten uit een eerdere studie).

---

### **3.3 Belang**

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

Deze studie is gericht op het verbeteren van het microbiom van de nasopharynx in vleeskalveren, wat een economisch belang dient voor de vleeskalverindustrie. Een ander belangrijk aspect van het verminderen van luchtweginfecties bij vleeskalveren is de daarmee gepaard gaande afname in antibioticum behandelingen van vleeskalveren. Vermindering van antibioticum gebruik in de dierhouderij is een belangrijk speerpunt van de overheid omdat het niet alleen bijdraagt aan een duurzame veeteelt, maar belangrijker, tevens bijdraagt aan vermindering van antibioticumresistentie ontwikkeling in en selectie van (multi-)resistente humaan pathogene micro-organismen zoals MRSA en ESBL. Het ontstaan van (multi-)resistente micro-organismen is een grote bedreiging van de volksgezondheid en daarom een belangrijk aandachtspunt van de overheid.

Op dit moment wordt behoorlijk veel dier-tot-dier variatie waargenomen, waardoor de benodigde groeps grootte volgens de gehanteerde parameters rond de 40 dieren ligt. Het is goed mogelijk dat deze variatie (gedeeltelijk) verklaard kan worden door verschillen in luchtweggezondheid. Inzicht in het nasopharyngeaal microbiom kan daardoor wellicht leiden tot minder dier-tot-dier variatie, waardoor de groeps groottes in de toekomst wellicht kleiner kunnen worden en er dus minder proefdieren nodig zijn. Uiteindelijk zou het zelfs kunnen leiden tot unieke individuele behandeling van vleeskalveren waardoor het aantal veterinaire ingrepen beperkt kan worden omdat er minder groepsbehandelingen nodig zijn.

---

### **3.4 Onderzoeksstrategie**

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

Het project is onderverdeeld in een aantal stadia. In een eerder stadium is middels een pilot experiment uitgezocht dat het mogelijk is middels nasopharyngeale swabs de microbiom-ontwikkeling in jonge vleeskalveren te kunnen vervolgen. In een vervolgonderzoek is gekeken naar de dynamiek van de ontwikkeling van het nasopharyngeaal microbiom gedurende de eerste 12 weken van de kalveren op het mestbedrijf. Hieruit is gebleken dat het nasopharyngeaal microbiom gedurende de eerste 12 weken van de vleeskalveren op het mestbedrijf aan behoorlijke veranderingen onderhevig is. In de volgende studies zal naar de gehele mestperiode (27 weken vanaf het moment van binnenkomst van de kalveren op het mestbedrijf) worden gekeken zodat

effecten door de interventies gedurende de gehele mestperiode gevolgd kunnen worden.

Op basis van deze gevonden dynamiek in het nasopharyngeaal microbioom is de verwachting dat het mogelijk is om het nasopharyngeaal microbioom te beïnvloeden. Op basis van informatie over de invloed van dieet op het nasopharyngeaal microbioom van kinderen, is besloten om te onderzoeken of verschillende diëten en neussprays een vergelijkbare invloed hebben op het nasopharyngeaal microbioom van vleeskalveren. Het is de bedoeling om te onderzoeken of het mogelijk is om door middel van voedingsinterventies en het toedienen van neussprays, het nasopharyngeaal microbioom zodanig te beïnvloeden dat het aantal luchtweginfecties vermindert en daardoor de algehele gezondheid van vleeskalveren verbetert. Eerdere preliminaire bevindingen van de betrokken kalverhouderij lijken te wijzen op een positief effect op gezondheid en groei van vleeskalveren door verschillende, wettelijk toegelaten voedingsadditieven en neussprays. Op basis van die preliminaire resultaten is besloten om (combinaties van) deze wettelijk toegelaten voedingsadditieven en neussprays te testen op bevestiging van de preliminaire positieve resultaten op gezondheid en groei en tevens te onderzoeken of dit gepaard gaat met een verandering van het nasopharyngeaal microbioom.

De beoordeling van de gezondheid en kwaliteit van vleeskalveren en daarmee het effect van de interventies in deze studie vindt plaats op basis van meerdere parameters die standaard in de praktijk worden toegepast (individuele veterinaire behandelingen, verteringscore, voedingsconversie en geslacht gewicht). Eerdere ervaringen van de betrokken kalverhouderij partij hebben uitgewezen dat de benodigde groepsgrootte voor een significante uitlezing van deze parameters ( $\Delta x = 2; 1,5; 0,1; 6$ , respectievelijk) varieert van 31-42 dieren. Vanwege de beschikbare ruimte (ruimte voor 200 kalveren) in de stal van het proefbedrijf waar de eerste proef gepland is, is besloten om gebruik te maken van 5 groepen van 40 dieren elk zodat er naast twee controle groepen (basaal en positief), ook drie testgroepen mee genomen worden in deze eerste proef.

De indeling in de drie testgroepen voor de eerste proef is gebaseerd op de aard van de additieven (1: melk gebaseerd, 2: additieven zoals bijv. prebiotica in combinatie met een neusspray van een bacteriecultuur, en 3: een mix van etherische oliën, zowel toegediend via de melk als via een neusspray) waarbij meerdere additieven per testgroep worden gebruikt. Afhankelijk van de resultaten zal voor latere proeven besloten worden welke groep(en) van ingrediënten verder onderzocht zal worden door de additieven uit te splitsen en/of te combineren of op andere wijze te optimaliseren. Hierbij kan gedacht worden aan optimale dosering, de optimale periode waarin de interventie wordt gegeven en de optimale toedieningsroute in praktijksituaties. De uitlezing zal in alle gevallen bestaan uit de normale parameters voor vleeskalveren: gewicht, diarree, vertering en veterinaire behandelingen. Daarnaast zal ook de kwaliteit van de slachtproducten worden gecontroleerd, waarbij in dit geval met name gelet zal worden op de longen.

---

#### 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 verschillende studies zullen in hoofdlijnen vergelijkbaar zijn. In alle gevallen zal worden gewerkt met vleeskalveren in de reguliere veehouderij bij verschillende proefbedrijven die voldoen aan alle wettelijke normen voor de vleeskalveren industrie en de IKB richtlijnen hanteren.

Op hoofdlijnen zal een studie er als volgt uitzien:

1. De kalveren komen op de normale wijze (= normale wijze voor vleeskalveren in de industrie) binnen op het proefbedrijf op een leeftijd van 2-3 weken. Vanaf dat moment verblijven de dieren 27 weken op het mestbedrijf voordat ze richting slacht gaan.
  2. De kalveren worden bij binnenkomst op het proefbedrijf opgedeeld in verschillende groepen, het aantal daarvan en de grootte per groep is afhankelijk van het aantal te meten condities. Per studie zullen in ieder geval twee controlegroepen worden meegenomen, afhankelijk van het aantal te testen condities en de beschikbare ruimte op het proefbedrijf zal besloten worden hoeveel groepen en hoeveel dieren per groep worden ingezet.
  3. De huisvesting van de kalveren wordt aangepast aan de omstandigheden van het gebruikte proefbedrijf waarbij zorg wordt gedragen dat dieren van verschillende testgroepen gecombineerd worden over de beschikbare afdelingen
-

4. De kalveren worden gevoerd volgens de indeling per groep waarbij de melk en de additieven (voeder additieven en/of neus sprays bestaande uit een bacteriën cultuur of een mix van etherische oliën) individueel wordt gevoerd en het ruwvoer (muesli, geperste brokken + granenmengsel en stro) niet individueel wordt gevoerd.
5. Tijdens de groei wordt de gezondheid van de dieren gemonitord aan de hand van standaard praktijk metingen
6. Dierproef: Op maximaal zeven tijdstippen binnen de mestperiode van de vleeskalveren op het mestbedrijf (27 weken vanaf binnenkomst op het mestbedrijf) worden nasopharyngeale en rectale swabs genomen voor analyse van de microbiom samenstelling van de nasopharynx en het colon.
7. Na 27 weken op het mestbedrijf worden de dieren volgens reguliere wijze voor de slacht aangeboden.
8. Omdat er in de eerst geplande proef verschillende additieven en neussprays worden gecombineerd, zal een positief resultaat gevolgd worden door het uitsplitsen van de additieven en/of neussprays om te identificeren welke component of combinatie van componenten verantwoordelijk is voor het gevonden resultaat. Latere experimenten zullen uitgaan van de eerder gevonden resultaten om de effecten door de voedingsadditieven of neussprays verder te optimaliseren. Hierbij zal gekeken worden naar de optimale wijze van toedienen, het bepalen van de optimale dosis en het bepalen van de optimale doseringstijd. Ook als er geen positief resultaat wordt behaald bij de eerste proef en hiervoor na analyse van alle data geen voor de hand liggende verklaring is, zullen de additieven en neussprays individueel of in kleinere combinaties getest worden om eventuele negatieve gevolgen van de additieven op elkaar uit te sluiten. Vervolgens kunnen andere combinaties worden samen gesteld en kan de optimalisatie verder verlopen zoals bij een positief resultaat.

---

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 dierproef is onderdeel van de normale procedure voor mesten van vleeskalveren. In de verschillende studies worden de dieren random ingedeeld in verschillende groepen zoals beschreven in 3.4.2. De verschillende groepen krijgen verschillende voersamenstellingen te eten, al dan niet aangevuld met een neusspray. Alle voeder additieven en neussprays zijn geregistreerde en toegelaten middelen. Vervolgens zal op maximaal zeven tijdstippen een nasopharyngeale en fecale swab worden genomen die vervolgens geanalyseerd zal worden op microbiële samenstelling.

De vleeskalveren worden verder volgens de reguliere vleeskalveren procedure gemest en behandeld. De interventies zoals beschreven in de dierproef hebben geen invloed op de geschiktheid van de dieren voor de slacht. De dieren worden daarom na 27 weken op het mestbedrijf volgens normale wijze voor de slacht aangeboden.

---

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

Volgnummer	Type dierproef
1	Het nemen van neusholte samples ter identificatie van de microbiële samenstelling van de nasopharyngeale microbioom en fecale swabs om het microbioom van de darm te bepalen.
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	



## Format

### Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

## 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Bevorderen van de luchtweggezondheid van vleeskalveren
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | respiratoire infecties, voedingsinterventies, kalvergezondheid, microbiom

## 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- 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
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*

### 3 Projectbeschrijving

- |   |  |
|---|--|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | <p>Jonge kalveren tot 14 weken leeftijd zijn erg gevoelig voor luchtweginfecties (respiratoire infecties) doordat het immuunsysteem nog niet volledig is ontwikkeld. Deze luchtweginfecties zorgen voor ziekte en uitval onder de vleeskalveren. Luchtweginfecties worden veelal veroorzaakt door micro-organismen die onderdeel vormen van het nasopharyngeale microbioom (de complexe microbiële flora van de omgeving van de neus dichtbij de keel), die na een onbalans de overhand nemen en luchtweginfecties veroorzaken.</p> <p>De doelstelling in dit project is te onderzoeken of door middel van het variëren van de voeding van vleeskalveren, het nasopharyngeale microbioom van deze kalveren positief is te beïnvloeden om daarmee het aantal luchtweg infecties te verminderen en de algehele gezondheid te verbeteren.</p> |
| 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?         | <p>De verwachting is dat deze studie zal leiden tot een verbeterde gezondheid van vleeskalveren, waardoor minder uitval plaats zal vinden. Daarnaast is verbeterde kalfsgezondheid ook zeer gewenst vanuit humane gezondheid. Bij ziekte van vleeskalveren wordt er antibiotica toegediend wat kan leiden tot een toename van resistente, pathogene micro-organismen zoals bijv. MRSA en ESBL bacteriën die een grote bedreiging vormen voor de mens. Vermindering van het antibioticumgebruik in de veehouderij is daarom een speerpunt van de overheid en het verbeteren van de gezondheid van vleeskalveren door voedingsinterventies is een zeer aantrekkelijke methode.</p>   |
| 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?  | <p>Ongeveer 1200 stierkalveren uit Nederland die na afloop van de dierproef het reguliere slachtcircuit ingaan.</p>  |
| 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?   | <p>De kalveren worden op de normale manier gehuisvest en opgekweekt zoals alle andere vleeskalveren. De daadwerkelijke dierproef bestaat uit het nemen van swabs door een lang wattenstaafje hoog door de neusholte te halen, eventueel aangevuld met het prikken van een buisje bloed en het verzamelen van poep uit de anus met een wattenstaafje gedurende maximaal zeven tijdstippen. Uit eerdere ervaringen is gebleken dat deze handelingen minimaal effect hebben op de kalveren.</p>   |
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?   | <p>In de laagst mogelijke categorie: de dieren doorlopen het normale opkweekproces tot aan de slacht en ondervinden minimaal ongemak door de interventies.</p>   |
| 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?   | <p>Na afloop van het experiment zullen de dieren als normale vleeskalveren worden geslacht voor consumptie.</p>  |



## 4 Drie V's

### 4.1 **Vervanging**

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

Door de opzet van de studie kunnen er praktijkdieren gebruikt worden die het normale vleeskalverhouderijproces doorlopen, waardoor er geen proefdieren speciaal voor deze studie ingezet hoeven te worden. Dit heeft tevens als voordeel dat er direct wordt getest in de uiteindelijke doelgroep.

Niet alleen de microbiële samenstelling van de neusholte is zeer divers, ook de interactie tussen de gastheer (in dit geval de vleeskalveren) en de micro-organismen is zeer complex. Mede hierdoor zijn er (nog) geen geschikte proefdiervrije alternatieven.

### 4.2 **Vermindering**

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

De dieren worden niet speciaal voor de studie gebruikt, maar voor de reguliere kalfsvlees productie. De groepsgrootte is zodanig gekozen dat ook bij normale uitval van dieren nog statistisch betrouwbare conclusies kunnen worden getrokken.

### 4.3 **Verfijning**

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

De gekozen proefdiersoort (vleeskalveren) is tevens het doeldier van de studie. Door het minimale ongerief voor de dieren kan de studie uitgevoerd worden onder normale praktijkomstandigheden. De resultaten van deze studie zijn daarom direct vertaalbaar naar de vleeskalverhouderij en de gezondheidszorg voor deze dieren.

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

De proefdieren worden gehuisvest en behandeld als elk ander vleeskalf volgens de IKB regeling. Het ongerief wat de dieren ondervinden gedurende de studie is minimaal door het milde karakter van de handelingen (samen door middel van een wattenstaafje of bloedafname) en het feit dat de samples worden genomen door bevoegd en ervaren personeel.

**5** In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

## 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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef  |
|------------|---|
| 1          | Het nemen van neusholte samples ter identificatie van de microbiële samenstelling van het nasopharyngeaal microbioom. |
- 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 studie is het onderzoeken of door middel van voedingsinterventies en toediening van neussprays, het mogelijk is om het nasopharyngeaal microbioom te beïnvloeden en daarmee een positief effect op de respiratoire gezondheid van vleeskalveren te bereiken.

Door de wijze waarop vleeskalveren worden gemest, is het goed mogelijk om individuele voedingsinterventies uit te voeren binnen de kaders en richtlijnen van de reguliere vleeskalverhouderij. Er is voor deze studie daarom gekozen om gebruik te maken van reguliere vleeskalveren zodat de proefdiersoort gelijk is aan de diersoort waar de interventie voor bedoeld is.

Omdat de respiratoire gezondheid een directe weerslag op de algemene gezondheid van de kalveren heeft, zal de algehele gezondheid van de vleeskalveren worden gemonitord volgens de normale richtlijnen voor vleeskalveren. Daarnaast zal ook de samenstelling van het nasopharyngeaal microbioom worden bepaald. Hiervoor zullen nasopharyngeale swabs worden genomen van de kalveren. Uit die swabs wordt DNA geëxtraheerd waarna de microbiële

samenstelling bepaald wordt door middel van 16S amplicon sequencing (een methode waarbij de bacteriële diversiteit van een sample bepaald wordt door het uitlezen van de in dat sample aanwezige 'barcodes', de ribosomale 16S sequenties). Omdat darmgezondheid ook veel in verband wordt gebracht met gezondheid en er voedingsadditieven worden gebruikt die uiteindelijk ook in de darm terecht komen, zullen ook fecale swabs worden genomen die eveneens door middel van 16S amplicon sequencing geanalyseerd zullen worden. De algehele gezondheidsparameters en de samenstelling van het nasopharyngeale microbioom worden vervolgens gekoppeld om een eventueel verband tussen voedingsinterventies of het toedienen van neussprays, de samenstelling van het nasopharyngeale en darm microbioom en de algehele gezondheid van de kalveren te bepalen.

---

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.

Een representatief voorbeeld van de proefopzet is de planning voor het eerste experiment.

In deze eerste proef zullen tweehonderd (200) kalveren worden gehuisvest in vijf groepen, verdeeld over vier gescheiden afdelingen.

De kalveren worden onder reguliere omstandigheden op een regulier vleeskalverbedrijf gehuisvest. In vervollexperimenten zou kunnen worden uitgeweken naar andere reguliere vleeskalverhouderijen. Een ander bedrijf zou gevolgen kunnen hebben op het aantal dieren en de indeling van de dieren in afdelingen. Op het bedrijf waar de eerste proef plaats zal vinden en tevens op elk ander bedrijf wat gebruikt zou kunnen worden, worden de voorschriften volgens de regeling 'IKB vleeskalveren' nageleefd. De IKB regeling (<http://www.ikbvleeskalveren.nl/site/Vleeskalveren-blank/IKB-regeling/9>) is het kwaliteitsbeheersingssysteem van de Nederlandse kalverhouderij en omvat eisen die strenger zijn dan de wettelijke eisen voor huisvesting van vleeskalveren. Elke groep krijgt naast gemeen ruw voer een eigen melk gebaseerde en per dier individueel toegediende voeding, al dan niet aangevuld met een dagelijks toegediende neusspray bestaande uit een bacteriecultuur of een mix van etherische oliën. De variaties in het individueel toegediende voer bestaan uit variaties van geregistreerde en toegelaten voedingsadditieven. De verschillende kalvergroepen zullen worden gevolgd in de tijd door de standaard metingen die gebruikelijk zijn in de reguliere kalverhouderij (wegingen, diarreescore, verteringscore, bloedanalyse, bijhouden van eventuele uitval en individuele veterinaire handelingen). De melk gebaseerde voeding met de variaties aan voedingsadditieven wordt individueel toegediend waardoor het mogelijk is om overgebleven voer terug te wegen en de intake per dier additief te bepalen. Van belang voor deze projectaanvraag is dat daarnaast ook maximaal 7 nasopharyngeale en fecale swabs van elk dier worden afgenomen gedurende een periode van 27 weken op het mestbedrijf voor het bepalen van de nasopharyngeale en fecale microbiomsamenstelling. Het nemen van de nasopharyngeale swabs vindt plaats door de swab via de neus in te brengen tot de nasopharyngeale holte, wat inhoudt dat de swab ongeveer tot een diepte ter hoogte van het oog wordt ingebracht. Voor het nemen van fecale swabs is een diepe penetratie niet noodzakelijk. Alle samples voor de dierproef zullen worden genomen door bevoegd en getraind personeel wat in eerdere studies heeft bewezen de samples te kunnen nemen met minimale impact op de dieren.

In eventuele vervollexperimenten zal de indeling in groepen kunnen afwijken van bovenstaand schema, samples zullen echter op vergelijkbare wijze en frequentie worden genomen en geanalyseerd.

Het effect van de verschillende voedingsadditieven en neussprays zal worden bepaald aan de hand van de algehele gezondheid van de kalveren en de samenstelling van het fecale microbioom, maar met name het nasopharyngeale microbioom. De algehele gezondheid zal worden beoordeeld door de behandelende dierenarts en het verzorgend personeel aan de hand van de standaard parameters (Gewicht, diarree, vertering, en veterinaire behandelingen. Uitval zal ook worden bijgehouden, maar dit zal niet als uitlees-parameter worden gehanteerd). Daarnaast zal ook de uitlezing van de microbiota, met name het nasopharyngeale microbioom een beeld geven van de gezondheid van de kalveren. Beide metingen zullen worden gecombineerd om een verband tussen voedingsinterventies, gezondheid en het nasopharyngeale microbioom te identificeren.

---

Als er kalveren ziek worden zal de behandelend dierenarts besluiten tot behandeling van zieke dieren conform de normale aanpak binnen de kalverhouderij.

Dit houdt in dat afhankelijk van de symptomen, verschillende behandelingen mogelijk zijn, zoals bijvoorbeeld het toedienen van aspirine tegen koorts, extra vitamine C om de weerstand te verbeteren, lijnzaadolie om de vertering te verbeteren, of het toedienen van antibiotica. Behandeling van zieke dieren is onderdeel van de reguliere veehouderij en vormt dus géén onderdeel van deze dierproef. De reden om deze informatie hier toe te voegen is dat het gebruik van antibiotica invloed kan hebben op de onderzochte parameters. Afhankelijk van het aantal zieke dieren per testgroep (elke testgroep wordt beschouwd als een apart koppel) wordt besloten om alleen de zieke dieren te behandelen of de gehele testgroep. In eerste instantie worden alleen individuele dieren behandeld, tenzij 10% van de testgroep in vijf voorafgaande dagen is behandeld of er 4% ziekteverval is in de laatste 24 uur, in dat geval wordt de gehele testgroep behandeld met antibiotica.

---

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

Eerder werk heeft uitgewezen dat het uitlezen van het nasopharyngeale microbioom bij 15 dieren per bedrijf op 8 bedrijven, aangevuld met 30 fokkalveren op 1 bedrijf, voldoende informatie oplevert voor een goede uitlezing van de microbiële dynamiek in de nasopharynx. In het huidige experiment wordt gekeken naar het nasopharyngeale microbioom in relatie tot algehele gezondheid en groei van de vleeskalveren. De beoordeling van de gezondheid en kwaliteit van vleeskalveren en daarmee het effect van de interventies in deze studie vindt plaats op basis van meerdere parameters die standaard in de praktijk worden gemeten (individuele veterinaire behandelingen, verteringsscore, voedingsconversie en geslacht gewicht). Eerdere ervaringen van de betrokken kalverhouderij hebben uitgewezen dat de benodigde groepsgrootte voor een significante uitlezing van deze parameters ( $\Delta x = 2; 1,5; 0,1; 6$ , respectievelijk) varieert van 31-42 dieren. Vanwege de beschikbare ruimte in de stal (ruimte voor 200 kalveren) is besloten om voor de eerste proef gebruik te maken van 5 groepen van 40 dieren elk. In latere experimenten zal een vergelijkbare groepsgrootte worden gehanteerd.

Per experiment zijn twee controlegroepen inbegrepen om een goede vergelijking te kunnen doen: een controlegroep die standaard voer krijgt wat gebruikt wordt in de reguliere kalverhouderij (de basis controle) en een controlegroep die een rijk dieet krijgt waarvan bekend is dat het een positief effect heeft op de groei en gezondheid van de kalveren, maar te duur is voor standaard gebruik in de praktijk (positieve controle). Naast de controlegroepen worden ook testgroepen meegenomen, het exacte aantal hiervan hangt af van de hoeveelheid te testen additieven en de beschikbare ruimte op het proefbedrijf. In de eerstvolgende studie worden drie testgroepen meegenomen. Vanwege de beschikbare ruimte (ruimte voor 200 kalveren) in de stal van het proefbedrijf waar de eerste proef gepland is, is besloten om gebruik te maken van 5 groepen van 40 dieren elk.

De verdeling van de dieren over de testgroepen gebeurt door de dieren bij binnenkomst op het proefbedrijf random te verdelen over de testgroepen. De ervaring van de betrokken kalverhouderij is dat het effect van het melkveebedrijf van de kalveren sterker is dan het effect van het opvangcentrum en transport. Daarom is er besloten geen gebruik te maken van een block design bij de indeling van de kalveren over de stal. Voorafgaand aan het experiment kan er nog een herverdeling van de dieren plaatsvinden op basis van het opzetgewicht en het Hb-gehalte zodat de testgroepen zo evenredig mogelijk verdeeld zijn over de groepen.

De indeling in de drie testgroepen voor de eerste proef is gebaseerd op de aard van de additieven (1: twee op melk gebaseerde componenten, 2: vijf additieven zoals bijv. prebiotica in combinatie met een neusspray van een bacteriecultuur, en 3: een mix van etherische oliën, zowel toegediend via de melk als via een neusspray). Afhankelijk van de resultaten zal voor latere proeven besloten worden welke groep(en) van ingrediënten verder onderzocht zal/zullen worden door de additieven uit te splitsen en/of te combineren of op andere wijze te optimaliseren. Hierbij kan gedacht worden aan optimale dosering, de optimale periode waarin de interventie wordt gegeven en de optimale toedieningsroute in praktijksituaties.

Uitval van vleeskalveren komt in vrijwel elke mestperiode voor en lijkt grotendeels afhankelijk van de oorsprong van de kalveren. Door de milde aard van de handelingen binnen de dierproef is niet te verwachten dat deze interventies voor een hogere uitval zorgen. Gebaseerd op eerdere ervaringen (van de betrokken kalverhouderij) is het verwachte uitvalspercentage  $\sim 5\%$ , waardoor niet wordt verwacht dat normale uitval tot problemen gaat leiden voor de groepsgrootte.

## B. De dieren

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

De proefdiersoort is gelijk aan de diersoort waar de maatregelen uiteindelijk voor bedoeld zijn: reguliere vleeskalveren. De dieren in deze studie zijn standaard stierkalveren die afkomstig zijn van verschillende melkveebedrijven. De exacte oorsprong en ras is op moment van aanvraag nog niet bekend, dit is afhankelijk van de beschikbaarheid van kalveren op de aangesloten bedrijven. Er is gekozen voor het gebruik van stierkalveren omdat deze de bulk vormen van de gebruikte vleeskalveren. Hoewel dit afwijkt van de praktijk, waar een klein deel (max. 15%) van de vleeskalveren bestaat uit vaarskalveren, is er gekozen om alleen stierkalveren te gebruiken binnen deze studie om de variatie zo klein mogelijk te houden en daarmee het benodigde aantal dieren zo laag mogelijk te houden. Vaarskalveren die onder normale omstandigheden op dit bedrijf terecht zouden komen, worden nu verspreid over andere praktijk bedrijven en blijven dus niet over, maar volgen het normale mest-regime. De kalveren komen op een leeftijd van 2-3 weken aan op het bedrijf waar de dieren gedurende deze studie gehuisvest worden. Bij aankomst zullen de dieren random verdeeld worden over de verschillende proefgroepen zoals beschreven in sectie 'A' van deze bijlage. Gemeten vanaf het moment van aankomst zullen de kalveren gedurende een periode van 27 weken op dit bedrijf gehuisvest worden, waarna de normale slachtprocedure gevolgd zal worden.

Vanwege de looptijd van één studie (ongeveer een half jaar) en de bijbehorende voorbereidingen en uitwerkingen, wordt geschat dat per jaar een gemiddelde van 1 tot 1,5 studies kan worden uitgevoerd. Om de vervolgvragen omtrent de gehele studie te kunnen beantwoorden, wordt geschat dat er 6-8 studies noodzakelijk zijn. Dit zou de maximale projectperiode van 5 jaar kunnen overschrijden. Voor de eerste 5 jaar van dit project schatten wij derhalve in ongeveer 1200 (het equivalent van 6 studies) kalveren te gebruiken.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

De kalveren die in deze studie worden meegenomen, volgen een normaal mestschema en zullen na afloop hiervan worden geslacht, net als reguliere vleeskalveren die geen onderdeel zijn van deze studie. Er worden dus géén dieren specifiek voor het uitvoeren van deze studie gebruikt.

De betrokken partij uit de vleeskalverenindustrie is zeer goed thuis in het werk wat is uitgevoerd aan kalvergezondheid. De reden voor de aangevraagde studie is het gebrek aan kennis op het gebied van studies naar verbeterde respiratoire gezondheid bij deze partij. Een literatuurstudie laat zien dat er zeer weinig literatuur beschikbaar is over respiratoire gezondheid van kalveren. De literatuur die wel beschikbaar is, is gericht op respiratoire aandoeningen in kalveren (zie bijv. het proefschrift van Bart Pardon, 2012, Universiteit van Gent) maar niet op het verbeteren van respiratoire gezondheid van kalveren door middel van voedingsinterventies.

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 nemen van de diepe neus (nasopharyngeale) swabs resulteert in minimaal ongerief bij de kalveren en worden bovendien uitgevoerd door bevoegd en goed opgeleid personeel met veel ervaring op dit gebied. Hetzelfde personeel neemt ook de fecale swabs, wat door de minimale invasieve handeling nog minder ongerief veroorzaakt bij de dieren.

## 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.

Bij de betrokken kalverhouderij is geen kennis van vergelijkbare dierproeven die zijn uitgevoerd in de sector. Het enige bekende werk is het eerdere, preliminaire onderzoek naar het effect van de additieven en neussprays waarbij nu wordt gezocht naar een link met het nasopharyngeaal microbiom en gezondheid

## 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.

Vanwege de opzet van de studie in een praktijk setting (een regulier vleeskalverenbedrijf wat is aangesloten bij SKV), worden de dieren gehuisvest en behandeld als alle reguliere vleeskalveren zoals vastgelegd in de regeling IKB vleeskalveren, welke strengere eisen heeft ten aanzien van huisvesting en behandeling dan de wettelijk verplichte regels.

### 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.

Dit betreft een commercieel praktijkbedrijf voor vleeskalveren.

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

Het gekozen proefbedrijf is aangesloten bij SKV en voldoet aan de eisen van de regeling IKB vleeskalveren en voldoet daarmee ruim aan alle wettelijke eisen voor huisvesting en behandeling. Historisch gezien is dit proefbedrijf een bedrijf wat laag zit in het aandeel afgekeurd vlees, lever en nieren, wat een indicatie is voor goede zorg van de dieren. De dierproefhandelingen worden uitgevoerd door bevoegd personeel met veel ervaring op dit gebied.

Als extra controle op de respiratoire gezondheid van de dieren zal bij de slacht (dus ná afloop van de dierproef) gelet worden op de kwaliteit van de longen.



## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De dieren worden gehuisvest en behandeld als elk ander vleeskalf. Andere vormen van welzijnsaantasting dan het nemen van de nasopharyngeale swabs of het nemen van fecale swabs worden in het kader van dit project daarom niet voorzien.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Niet van toepassing.

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

Niet van toepassing

### 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.

Indien er volgens de behandelend dierenarts sprake is van ondraaglijk leed of sprake is van een uitzichtloze situatie kan de behandelend dierenarts besluiten tot euthanasie van het betreffende dier. Dit zal verlopen zoals bij elk ander regulier vleeskalver bedrijf. De verwachting is dat de dierproef geen invloed zal hebben op het aantal dieren waarop euthanasie gepleegd zal moeten worden.

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

Op basis van historische ervaringen binnen dit bedrijf is de verwachting dat een totaal van ~5% van de dieren gedurende de looptijd van het experiment zal uitvallen. Hierbij dient aangetekend te worden dat wellicht niet al deze dieren geëuthaniseerd zullen worden, een gedeelte zal ook zonder menselijk ingrijpen kunnen overlijden.

De behandelend dierenarts zal indien mogelijk, altijd voor kiezen om een ziek dier te behandelen volgens de normale praktijk behandelingen, euthanasie is slechts de laatste uitweg. Het welzijn van de dieren zal worden geborgd als elk ander vleeskalf dat wordt gemest op een bedrijf welke voldoet aan de IKB certificering.



### K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Het ongerief van de dieren wordt geclassificeerd als 'licht' door het diepe inbrengen van swabs via de neus om de nasopharyngeale monsters te kunnen nemen. Het nemen van fecale swabs resulteert in zulk minimaal ongerief dat dit ongerief wegvalt bij het nemen van de nasopharyngeale swabs.

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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:
2. Titel van het project: Bevorderen respiratoire gezondheid van vleeskalveren.
3. Titel van de NTS: Bevorderen van de luchtweggezondheid van vleeskalveren.
4. Type aanvraag:
  - X nieuwe aanvraag projectvergunning
  - wijziging van vergunning met nummer
5. Contactgegevens DEC:
  - naam DEC-TNO
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - X ontvangen door DEC 22-7-2015
  - aanvraag compleet NVT
  - x in vergadering besproken op 5-8-2015
  - X anderszins behandeld 20-8-2015 (emailronde)
  - X termijnonderbreking(en) van 14-8-2015 tot 20-8-2015
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen NVT
  - X aanpassing aanvraag versie nummer (2)
  - X advies aan CCD 01-09-2015
7. Eventueel horen van aanvrager
  - Datum **5-8-2015**
  - Plaats **Zeist**
  - Aantal aanwezige DEC-leden **4 (inclusief voorzitter)**
  - Aanwezige (namens) aanvrager **Verantwoordelijk Onderzoeker**
  - Strekking van de vraag / vragen:

**De volgende vragen zijn mondeling bediscussieerd met de verantwoordelijk onderzoeker en vervolgens in één email ronde beantwoord.**

- 1) U beschrijft in *3.1 Achtergrond* dat het nasopharyngeaal microbioom gedurende de eerste 15 weken op het mestbedrijf aan behoorlijke veranderingen onderhevig is. Kunt u de logica onderbouwen die u beschrijft: "door deze dynamiek is het logisch om te veronderstellen dat het ook mogelijk moet zijn om het nasopharyngeaal microbioom (positief) te beïnvloeden door middel van voedingsinterventies of het gebruik van neussprays."
- 2) In *3.2 Doel* beschrijft u dat u het microbioom positief beoogd te beïnvloeden. Wat bedoelt u met het positief beïnvloeden van het microbioom?
- 3) Het is de DEC niet duidelijk wat uw onderzoeksstrategie is. Kunt u bij punt *3.4.1* de onderzoeksstrategie beschrijven daarbij includerend wat u in eerder onderzoek hebt gedaan en hoe hierop de strategie voor de keuzes voor interventies die u in de komende 5 jaar wilt onderzoeken zijn gebaseerd?
- 4) Wat bepaalt de keuze voor de interventies met voedingsadditieven en/of neussprays en waaruit bestaan de voedingsadditieven en neussprays? Kunt u de verwachte positieve beïnvloeding van het microbioom op basis van de werkingsmechanismen wetenschappelijk onderbouwen?
- 5) Kunt u in navolging met de informatie gegeven op basis van vraag 4 in de rest van uw aanvraag consistent maken wat u bedoelt met interventies en wanneer dat in de voeding of met een neusspray wordt toegediend?
- 6) Kunt u onderbouwen waarom u voor studies van verschillende tijdsduren kiest of heeft gekozen, u kiest voor 15, 25 of 27 weken volgen van het microbioom? En hoe verhoudt zich dit tot de leeftijd van de vleeskalveren?
- 7) U beschrijft dat: "Deze interventies zijn geselecteerd op basis van eerdere positieve resultaten." Kunt u aangeven wat de nieuwe elementen zijn in dit beoogde project en hoe u zich ervan verzekert dat het onderzoek geen duplicatie is van eerder onderzoek?
- 8) Kunt u in *3.4.2* aangeven welke strategische keuzes u zal moeten maken in de 6-8 beoogde experimenten. Hoe verhouden deze experimenten zich tot elkaar en hoe zullen de resultaten van de experimenten gebruikt worden in de keuzes voor de daaropvolgende experimenten?
- 9) Kunt u aangeven waarop u de aantallen bloed en feces monsters baseert en kunt u in *A van de bijlage beschrijving dierproeven* benoemen welke primaire uitkomstparameters uit deze monsternamen van belang zijn voor het beantwoorden van uw onderzoeksvragen?
- 10) De opzet van de experimenten is de DEC niet helder. Kunt u in de *bijlage beschrijving dierproeven in A (statistische methoden)* de volgende zaken helder maken op strategie niveau, eventueel aangevuld met een voorbeeld voor een eerste experiment:
  - a) Wat is het design van de beoogde experimenten, hoe zijn de experimentele groepen verdeeld, welke controle groepen heeft u mogelijk nodig en hoeveel en welke interventies combineert (max/min aantal) u in een experiment.

- b)Hoe bepaalt u alvorens u start met ieder nieuw experiment hoeveel dieren u per experimentele groep nodig heeft.
- c)Worden de dieren gerandomiseerd ingedeeld en zo ja hoe gebeurt dat. Worden de effecten en resultaten in het onderzoek blind gemeten? Hoe borgt u dat dit op ieder bedrijf toepasbaar is?
- 11) Kunt u in navolging van de informatie gegeven op basis van antwoord op vraag 10 in de rest van uw aanvraag helder maken wat u bedoelt met de termen groep en koppel?
- 12) In de *bijlage beschrijving dierproeven in A* in het kopje *behandeling* beschrijft u dat de kans groot is dat zieke kalveren antibiotica krijgen toegediend. De DEC vraagt zich af of de antibioticum behandeling op zichzelf niet al een effect zal hebben op het nasopharyngeaal microbioom. Hoe zult u de behandelde dieren meenemen in uw analyses en verwacht u voldoende power over te hebben om iets te kunnen zeggen over uw interventie?
- 13) Kunt u aangeven waarom het zo belangrijk is dat dit onderzoek plaatsvindt in een reguliere bedrijf voor mestkalveren. Waarom zou de data niet verkregen kunnen worden in een experimentele stal, waar de kalveren meer ruimte hebben omdat ze volgens bijlage III van de EU directive 2010/63/EU gehuisvest moeten worden?
- 14) Kunt u in *J. van de bijlage beschrijving dierproeven (Humane eindpunten)*: uitweiden over de verwachte 5% van vleeskalveren die uitvallen. Wat houdt deze uitval precies in en welk ongerief verwacht u dat gepaard gaat met deze uitval. Hoe borgt u dat gedurende de gehele proefperiode het welzijn bewaakt wordt en welke criteria hanteert u hiervoor?
- 15) t/m 25) Zijn editorials in de projectaanvraag en bijlage

- Strekking van het (de) antwoord(en)

### Zie vraag 8

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

**Ja**

### 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum **5-8-2015**
- Strekking van de vraag / vragen **Zie punt 7 horen aanvrager**
- Datum antwoord **20-8-2015**
- Strekking van het (de) antwoord(en)

**1) Een situatie waarin niet of nauwelijks verandering plaats vindt is een stabiele situatie waarbij veranderingen aanbrengen relatief veel moeite kost. Daarentegen zal in een labiele situatie minder moeite nodig zijn om een verandering aan te brengen. Het eerdere werk heeft aangetoond dat het nasopharyngeale microbioom**

- behoorlijk aan veranderingen onderhevig is, dus dat hier niet sprake is van een stabiele situatie. De verwachting is daarom dat met relatief weinig moeite een verandering aangebracht kan worden in het nasopharyngeale microbiom, bijvoorbeeld door middel van voedingsinterventies of het gebruik van neussprays.
- 2) Met het positief beïnvloeden van het microbiom wordt bedoeld dat het microbiom zo wordt gestimuleerd dat de van nature aanwezige opportunistisch pathogenen in het nasopharyngeale microbiom, geen kans krijgen om ziekte te veroorzaken. Op deze manier wordt gepoogd de algehele gezondheid van de dieren te verbeteren.
- 3) punt 3.4.1 is aangepast waarbij wordt aangegeven welke additieven en neussprays mogelijk worden gebruikt om te onderzoeken of deze daadwerkelijk een positief resultaat leveren op de algehele gezondheid van vleeskalveren door een vermindering van het aantal luchtweginfecties en of dit gepaard gaat met een verandering van het nasopharygeaal microbiom. Ook is aangegeven wat de basis is van de indeling van de groepen voor het eerste experiment en hoe de resultaten daarvan gebruikt worden om toekomstige experimenten in te delen.
- 4) De voedingsadditieven bestaan uit koemelk componenten, breed-spectrum additieven, waaronder prebiotica en een mix van etherische oliën. Daarnaast worden twee neussprays getest: een bacteriecultuur en een mix van etherische oliën. De keuze voor deze wettelijk toegelaten voedingsadditieven en neussprays is gebaseerd op eerdere preliminaire ervaringen dat deze additieven en neussprays een positief resultaat lijken te hebben op de groei en gezondheid van kalveren. Er is echter geen informatie waardoor dit effect veroorzaakt wordt. In het huidige werk wordt gekeken of deze additieven en neussprays inderdaad een positief resultaat hebben op de gezondheid van vleeskalveren en of dat gepaard gaat met een positieve stimulatie van het nasopharygeaal microbiom. Er is wetenschappelijke onderbouwing dat het dieet van jonge kinderen van invloed is op het nasopharygeaal microbiom (ref bekend bij DEC).
- 5) In de aanvraag is verduidelijkt wanneer het gaat om voedingsinterventies of neussprays.
- 6) Het eerdere werk is uitgevoerd tot een leeftijd van 12 weken na aankomst van de kalveren op het proefbedrijf. Hieruit bleek dat het nasopharygeaal microbiom tot die leeftijd erg dynamisch is. De strategie om de gezondheid van de kalveren te beïnvloeden is via het geven van voedingsadditieven en/of neussprays bestaande uit een bacteriecultuur of een mix van etherische oliën gedurende de gehele mestperiode. Er is daarom besloten om de gehele mestperiode mee te nemen in de sampling periode.
- 7) In eerder preliminair werk is gebleken dat de voor dit werk geselecteerde interventies een positief effect lijken te hebben op

de algemene ontwikkeling van vleeskalveren. In het voorliggende onderzoek is het de bedoeling deze positieve effecten te bevestigen, te verbeteren en te onderzoeken of dit gepaard gaat met positieve stimulatie van het nasopharyngeaal microbiom en een vermindering van het aantal luchtweginfecties. Het zou kunnen dat geobserveerde dier-tot-dier variatie (mede) veroorzaakt wordt door verschillen in luchtweggezondheid tussen de verschillende dieren. Een beter begrip van de dynamiek van het nasopharyngeaal microbiom kan daardoor leiden tot verbeterd begrip van individuele verschillen tussen dieren wat uiteindelijk zou kunnen leiden tot unieke individuele behandeling van dieren. Zo'n 'gepersonaliseerde' aanpak zou vervolgens moeten leiden tot een vermindering van veterinaire ingrepen zoals antibiotica behandelingen.

8) In 3.4.2 is aangegeven hoe de resultaten van elk uitgevoerd experiment worden gebruikt voor het opzetten van het volgende experiment. Uiteraard is dat afhankelijk van de resultaten, daarom is alleen aangegeven wat de te volgen strategie is.

9) Er is besloten om geen bloedmonsters te nemen. Deze handeling is daarom verwijderd uit de aanvraag. Fecale swabs zijn wel gepland omdat voedingsmiddelen op een zeker moment terecht komen in de darm en daar ook het microbiom kunnen beïnvloeden. Een goede darmgezondheid wordt steeds meer geassocieerd met een belangrijk aandeel in algehele gezondheid. Fecale swabs kunnen daardoor meer inzicht verschaffen in de link tussen luchtweggezondheid en darmgezondheid.

10)

a) Zoals gevraagd is dit deel uitgebreid met informatie over de geplande experimenten en welke beslissingen daaraan ten grondslag liggen.

b) Zoals is aangegeven in "bijlage beschrijving dierproeven in A (statistische methoden)" varieert voor het bepalen van een significant verschil tussen groepen voor verschillende parameters, de groepsgrootte tussen de 31 en 42 dieren. Aangezien deze parameters voor elk experiment van belang zijn, geldt deze groepsgrootte voor elk toekomstig experiment. De exacte groepsgrootte zal afhangen van de beschikbare ruimte en het aantal testgroepen, maar zal altijd in de buurt van de 31-42 dieren liggen.

c) De "bijlage beschrijving dierproeven in A (statistische methoden)" is aangepast en bevat nu informatie over het design van dieren over de groepen. Samengevat komt het er op neer dat er geen block design wordt toegepast. De dieren, afkomstig van verschillende melkveebedrijven, worden bij binnenkomst random verdeeld over de groepen. Voorafgaand aan het experiment worden de groepen nagelopen op opzet-gewicht en Hb-gehalte.

**Indien noodzakelijk, worden er nog dieren gewisseld tussen groepen om met zo gelijk mogelijke groepen te starten.**

**11) In het kader van deze experimenten, wordt een testgroep beschouwd als een koppel. In het voorstel en de bijlage is dit zo goed mogelijk omschreven als testgroep of groep.**

**12) Wij delen de verwachting dat een antibioticum behandeling invloed zou kunnen hebben op het nasopharyngeaal microbiom. Om de dieren niet onnodig bloot te stellen aan antibiotica, zullen de voor de kalverhouderijpraktijk gebruikelijke criteria worden gehanteerd voor het toedienen van antibiotica, ook voor het beslissen of individuele dieren behandeld worden met antibiotica of dat de hele testgroep (koppel) wordt behandeld (zie "bijlage beschrijving dierproeven in A (statistische methoden)" voor de details). Omdat de verwachting is dat vrijwel elk dier in ieder geval wel één antibioticum behandeling nodig zal hebben gedurende de mestperiode, worden dieren die een antibioticum behandeling ondergaan, gewoon meegenomen in de analyses. Wel wordt bijgehouden of en zo ja, hoe vaak een dier een antibioticum behandeling krijgt toegediend.**

**13) De reden om dit onderzoek uit te voeren op een regulier bedrijf voor mestkalveren, is tweeledig. De eerste reden is dat interventies die effect hebben in de dierproef, direct kunnen worden geïmplementeerd in de praktijk, omdat de experimentele setting gelijk is aan de praktijk. Daarnaast zorgt het gebruik van reguliere kalveren ervoor dat er geen dieren specifiek voor deze experimenten gebruikt hoeven te worden.**

**14) De verwachte 5% uitval houdt in dat op dit bedrijf er op basis van eerdere resultaten, ongeveer 5% van de kalveren dood gaat voor het einde van de mestperiode. De gezondheid van de dieren wordt gemonitord door de behandelend dierenarts. Deze zal in geval van ondraaglijk leed of een uitzichtloze situatie besluiten tot euthanasie, maar in gevallen waar nog wel een uitweg is, besluiten tot de beste behandeling zoals gebruikelijk in de praktijk. Gedurende het hele verblijf op het proefbedrijf worden de dieren gehouden volgens de richtlijnen van IKB, die strenger zijn dan de wettelijk vereiste regels.**

**15) t/m 25) zijn editorials die verwerkt zijn in de aanvraag**

- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag **Ja**

9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) **NVT**

- Aard expertise
- Deskundigheid expert
- Datum verzoek

- Strekking van het verzoek
- Datum expert advies
- Expert advies

## **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 **Ja**
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering.

**De leden hebben allen onafhankelijk en onpartijdig deel kunnen nemen aan de advisering mbt het betreffende project**

## **C. Beoordeling (inhoud):**

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord
  - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord
  - uit het oogpunt van productiedoeleinden verantwoord
  - wettelijk vereist
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en)
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een **substantieel** belang.

**De DEC heeft gediscussieerd over het belang van deze aanvraag. Belanghebbenden in dit onderzoek zijn de kalveren in de kalverhouderij. Zij hebben een belang met betrekking tot hun welzijn**



**en het preventief behandeld kunnen worden tegen luchtweginfecties. Andere belanghebbenden van dit project zijn humane en veterinaire patiënten die een nog werkend antibioticum nodig hebben. Wanneer kalveren preventief behandeld zouden kunnen worden tegen infecties dan zou het antibiotica gebruik in de kalverhouderij wellicht naar beneden kunnen. Het verminderd gebruik van antibiotica zal de antibiotica resistentie kunnen verminderen.**

**De DEC heeft uitgebreid gediscussieerd over de haalbaarheid van de beoogde interventies op het verminderen van infecties. De onderzoeker heeft de haalbaarheid en de potentie van de beoogde interventies in antwoord 4 benadrukt. Daarmee was de DEC overtuigd van de haalbaarheid en daarmee met het belang van specifiek deze studie. De DEC heeft unaniem besloten dat het totaal belang substantieel is. Het grote probleem van antibioticaresistentie wordt niet opgelost door deze studie, maar kan hier mogelijk wel aan bijdragen. Dit project is derhalve een mooi voorbeeld van het efficiënt samengaan van de aanwezigheid van het doeldier en onderzoek op het doeldier. Hiermee weegt het licht ongerief voor deze kalveren op tegen de stap die wordt gezet in de richting van minder antibiotica gebruik en minder luchtweginfecties en daardoor een kleinere sterftekans voor de dieren.**

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project

**De DEC is er van overtuigd dat met deze strategie, waarin op basis van resultaten, voor latere proeven de groepen en de interventies worden bepaald en de expertise van de onderzoekers en de nauwe samenwerking met praktijkbedrijven kan resulteren in wetenschappelijke onderbouwing van interventies die reeds beschikbaar zijn op de markt. Daarmee is niet alleen de mogelijke**

**werking bewezen, maar ook gelijk de weg gebaad om de behandeling in de praktijk te gaan gebruiken. De DEC mist alleen de achtergrond en rationale achter de te kiezen voedseladditieven en neussprays. De DEC begrijpt dat deze rationale nog niet in dit stadium gegeven kan worden. Daarom dient de IvD erop toe te zien dat de experimenten opgezet worden op een manier waarbij de keuzes van additieven, neussprays of mixen van etherische oliën logisch volgen uit empirische onderzoek of wetenschappelijke kennis.**

5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd

**De vleeskalveren in deze experimenten zijn gehuisvest in praktijkbedrijven. Daarmee worden doeldieren ook direct proefdieren. De DEC heeft gediscussieerd over de huisvesting en hier een vraag over gesteld. De onderzoeker heeft de DEC overtuigd van niet alleen de efficiënte opzet van dit experiment in de daadwerkelijke situatie, namelijk het vleeskalf in zijn eigen omgeving, maar ook de lastigheid om een dergelijk experiment onder de huisvestingsnormen van de EU directive 2010/63/EU uit te voeren. Want de infectiedruk is dusdanig beïnvloed door de stalbezetting dat dit experiment eigenlijk alleen nuttige informatie oplevert wanneer de dieren in een praktijk situatie gehuisvest zijn.**

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd

**Het ongerief is door de onderzoeker ingeschat als licht. De DEC is van mening dat dit een realistische inschatting is. Er is gediscussieerd hoe het ongerief van de neusswab zich verhoudt tot het inbrengen van een naald. De DEC schat op basis van de binnen de DEC**

**aanwezige expertise in dat het diep in de neus tot in de nasopharynx nemen van een neusswab minimaal evenveel ongerief met zich brengt als het inbrengen van een naald.**

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen.

**Om inzicht te krijgen in de effectiviteit van de voorgestelde interventies is het gebruik van kalveren essentieel. De DEC is ervan overtuigd dat de wijze van inrichten van deze experimenten elegant gebruik maakt van doeldieren in hun natuurlijke omgeving, waardoor de eventuele werking van de interventies geen translatieslag meer nodig heeft.**

8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.

**De onderzoeker heeft de DEC na het beantwoorden van vraag 10 er van overtuigd dat ongeacht van de locatie, ieder experiment opnieuw ontworpen zal worden op een manier waarbij zo min mogelijk dieren zullen worden ingezet. De DEC is er ook van overtuigd dat de keuzes voor de interventies die daadwerkelijk zullen worden onderzocht in de voorgestelde experimenten gebaseerd zijn op wetenschappelijke kennis en praktijk gerichte mogelijkheden.**

9. 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. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten

**De DEC is van mening dat het project in overeenstemming is met de vereisten ten aanzien van de verfijning van dierproeven. Door slachtkalveren te gebruiken, die toch al aanwezig zijn op een IKB gecertificeerd bedrijf, laten de onderzoekers zien, oog te hebben voor het op efficiënte wijze gebruiken van dieren in een zo optimaal mogelijk stalconditie. Daarnaast is door een nauwe samenwerking met de dierenarts verzekerd dat de dieren zo min mogelijk lijden door dieren geen behandeling te ontzeggen, maar gewoon de veterinaire zorg te bieden die ze nodig hebben.**

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

**De DEC is van mening dat de NTS een goede weergave is van het project.**

## **D. Ethische afweging**

De doeleinden van het project rechtvaardigen het voorgestelde gebruik van dieren (niet), de schade in de vorm van lijden, pijn en angst bij dit aantal dieren wordt (niet) gerechtvaardigd door het verwachte resultaat. Het is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Op termijn kan het project (geen) voordelen opleveren voor mens, dier of milieu

**Op grond van de onder C genoemde overwegingen is de DEC unaniem van mening dat het belang van de doelstelling opweegt tegen het ongerief aan de dieren. Het belang, namelijk inzicht in de beïnvloeding van het nasopharyngeaal microbioom door middel van voedingsinterventies bestaande uit koemelk componenten, breed-spectrum additieven en een mix van etherische oliën en neussprays bestaande uit een bacteriecultuur of een mix van etherische oliën om uiteindelijk de respiratoire gezondheid van vleeskalveren te verbeteren,**

**kalversterfte te verminderen en mogelijk het antibiotica gebruik terug te dringen, weegt naar mening van de DEC zwaarder dan het ongerief, bijna uitsluitend bestaande uit diepe neusswabs. Deze neusswabs bij maximaal 200 vleeskalveren per experiment zijn naar verwachting voor het dier onaangenaam en leiden cumulatief tot licht ongerief, maar het is kortdurend. Daarnaast is de DEC ervan overtuigd dat de onderzoeker een goede onderzoeksstrategie heeft om steeds op basis van nieuwe inzichten een nieuw experiment te starten. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het gebruik van de dieren in dit project gerechtvaardigd is.**

## **E. Advies**

### 1. Advies aan de CCD

- De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:
  - De vaststelling dat het project niet vergunning plichtig is
  - De volgende doorslaggevende ethische bezwaren
  - De volgende tekortkomingen in de aanvraag
- 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 een ministeriële ontheffing vereist
- X Overige door de DEC aan de uitvoering verbonden voorwaarden

X De DEC adviseert de vergunning te verlenen

### 2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus of op een meerderheids-minderheidsstandpunt

**Het advies is gebaseerd op consensus.**

*Advies DEC-TNO*

## **Voorwaarde**

- 1 De onderzoeker dient bij elk onderzoek de onderbouwing van de keuze van de te gebruiken voedingsadditieven en of neussprays aan de IvD voor te leggen.**



## Melding Machtiging

- U kunt met dit formulier een machtiging afgeven of beëindigen.
- U machtigt een natuurlijk persoon (zoals een adviseur) of een rechtspersoon (zoals een BV, stichting, vereniging) om uw zaken voor u te behartigen. De machtiging is voor maximaal vijf jaar geldig.
- Meer informatie vindt u op [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).

### 1 Gegevens aanvrager

- 1.1 Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.

Naam van de portefeuillehouder	[REDACTED]
KvK-nummer	27376655
NVWA deelnemernummer	50100

### 2 Gegevens gemachtigde

- 2.1 Vul één van deze nummers van de gemachtigde in: KvK-nummer, of Burgerservicenummer (BSN) Geef aan welk nummer u invult.

<input type="checkbox"/> KvK-nummer	[REDACTED]
<input checked="" type="checkbox"/> BSN	[REDACTED]

- 2.2 Wat zijn de gegevens van de gemachtigde?

Naam gemachtigde	[REDACTED]	<input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
Adres of postbus	Postbus 96800 2509 JE DEN HAAG	
Postcode en Plaats	2509 JE DEN HAAG	

### 3 Inhoud machtiging

- 3.1 Wilt u een nieuwe machtiging afgeven?  Ja > Geef bij vraag 3.3 aan wat de gemachtigde voor u mag doen.  
 Nee
- 3.2 Wilt u een machtiging intrekken?  Ja > Ga door naar vraag 4  
 Nee
- 3.3 Wat mag de gemachtigde voor u doen?
- Een projectvergunning aanvragen
  - Een wijziging op een verleende projectvergunning aanvragen
  - Een melding doorgeven op een verleende projectvergunning
  - Een bezwaarschrift indienen en daarover communiceren met de Centrale Commissie Dierproeven en alle andere handelingen verrichten die nodig zijn voor een goede afwikkeling van het bezwaarschrift.
  - Alle bovenstaande opties

### 4 Ondertekening

- 4.1 Ondertekenen het formulier en stuur het als bijlage met uw aanvraag mee via de beveiligde e-mailverbinding of per post:
- Ik heb dit formulier volledig en naar waarheid ingevuld. Ik verklaar dat ik bekend ben met alle voorwaarden van wet en regelgeving (Wod, dierproevenbesluit en dierproevenregeling).

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Naam gemachtigde

Datum

03 - 07 - 2015

Handtekening  
portefeuillehouder  
van de instelling

Handtekening  
gemachtigde

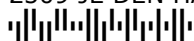




> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Organisatie TNO

Postbus 96800  
2509 JE DEN HAAG



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD501002015235

**Bijlagen**

2

Datum 01-09-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 1 september 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD501002015235. 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. Zodra uw aanvraag compleet is, ontvangt u binnen veertig werkdagen een beslissing op uw aanvraag. 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 wordt uw aanvraag buiten behandeling 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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.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

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 50100  
Naam instelling of organisatie: Organisatie TNO  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 27376655  
Postbus: 96800  
Postcode en plaats: 2509 JE DEN HAAG  
IBAN: NL391INGB0657819271  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: TNO

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

BSN: [REDACTED]  
Naam: [REDACTED]  
Postbus: 96800  
Postcode en plaats: 2509 JE Den Haag

Wilt u een nieuwe machtiging afgeven? Ja

Wat mag de gemachtigde doen?

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

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?

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

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 november 2015  
Geplande einddatum: 31 oktober 2020  
Titel project: Bevorderen respiratoire gezondheid van vleeskalveren  
Titel niet-technische samenvatting: Bevorderen respiratoire gezondheid van vleeskalveren  
Naam DEC: DEC-TNO  
Postadres DEC: 96800 2509 JE DEN HAAG  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:  Melding Machtiging  
 DEC-advies

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Den Haag  
Datum: 1 september 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Organisatie TNO

Postbus 96800  
2509 JE DEN HAAG



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD501002015235

**Bijlagen**

2

Datum 01-09-2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 1 september 2015

Vervaldatum: 1 oktober 2015

Factuurnummer: 201570235

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD501002015235	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Organisatie TNO

Postbus 96800

2509 JE DEN HAAG



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD501002015235

Datum 14 september 2015

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**

1

Geachte heer/mevrouw,

Op 1 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bevorderen respiratoire gezondheid van vleeskalveren" met aanvraagnummer AVD501002015235. 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 niet technische samenvatting bij uw aanvraag bevat enkele moeilijke woorden, zoals pathogene micro-organismen; IKB regeling; samplen. Daarnaast is het aantal dieren ongeveer aangegeven, kunt u hier een exact of een maximum aantal aangeven. Ook is het ongerief niet geclassificeerd in licht, matig, ernstig of terminaal.

Graag ontvangen wij een Niet technische samenvatting die voldoet aan de eisen. Deze eisen kunt u vinden op onze website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl).

**Beschrijving Dierproeven**

In de Beschrijving Dierproeven beschrijft u bij Vervanging, vermindering en verfijning dat er literatuuronderzoek is gedaan. Kunt u meer ingaan op de vervanging, vermindering en verfijning?

Graag ontvangen wij een Beschrijving Dierproeven die hierop is aangepast.

**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.

**Datum**

14 september 2015

**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD501002015235**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](http://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.

Bijlage:

- formulier Melding Bijlagen via de post





## Melding

### Bijlagen via de post

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

### 1 Uw gegevens

- 1.1 Vul de gegevens in.
- |                |  |            |
|----------------|--|------------|
| Naam aanvrager |  |            |
| Postcode       |  | Huisnummer |
- 1.2 Bij welke aanvraag hoort de bijlage?  
*Het aanvraagnummer staat in de brief of de ontvangstbevestiging.*
- |                |  |
|----------------|--|
| Aanvraagnummer |  |
|----------------|--|

### 2 Bijlagen

- 2.1 Welke bijlagen stuurt u mee?  
*Vul de naam of omschrijving van de bijlage in.*
- |                          |  |
|--------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |
| <input type="checkbox"/> |  |

### 3 Ondertekening

- 3.1 Onderteken het formulier en stuur het met alle bijlagen op naar:
- |              |   |      |
|--------------|---|------|
| Naam         |   |      |
| Datum        | - | - 20 |
| Handtekening |   |      |
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

Retouradres: Postbus 360, 3700 AJ Zeist

Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500EK DEN HAAG



Utrechtseweg 48  
3704 HE Zeist  
Postbus 360  
3700 AJ Zeist

www.tno.nl

T +31 88 866 60 00

**Onderwerp**

Reactie op aanhouden beoordelen AVD501002015235

Geachte mevrouw [REDACTED]

Bijgevoegd treft u onze reactie op uw schrijven van 14 september jl. tav enkele onduidelijkheden in aanvraag AVD501002015235.

1. Niet technische samenvatting: Wij hebben de moeilijke woorden vervangen, het aantal dieren voor de looptijd van het project gewijzigd van 'ongeveer 1200' naar 'maximaal 1200', en de classificatie van het ongerief aangegeven als 'licht'.
2. In de beschrijving dierproeven hebben wij de wijze waarop wij in dit project de 3V's toepassen, duidelijker verwoord. In onderstaande alinea ziet u in rood de wijzigingen die in de Bijlage Dierproeven zijn aangebracht.

**Vanwege de complexe interactie tussen gastheer en microbiota is onderzoek in een vleeskalf noodzakelijk.** De kalveren die in deze studie worden meegenomen, volgen een normaal mestschema en zullen na afloop hiervan worden geslacht, net als reguliere vleeskalveren die geen onderdeel zijn van deze studie. Er worden dus géén dieren specifiek voor het uitvoeren van deze studie gebruikt, **waardoor optimaal aan vermindering wordt gedaan.**

De betrokken partij uit de vleeskalverenindustrie is zeer goed thuis in het werk wat is uitgevoerd aan kalvergezondheid. De reden voor de aangevraagde studie is het gebrek aan kennis op het gebied van studies naar verbeterde respiratoire gezondheid bij deze partij. Een literatuurstudie laat zien dat er zeer weinig literatuur beschikbaar is over respiratoire gezondheid van kalveren. De literatuur die wel beschikbaar is, is gericht op respiratoire aandoeningen in kalveren (zie bijv. het proefschrift van Bart Pardon, 2012, Universiteit van Gent) maar niet op het verbeteren van respiratoire gezondheid van kalveren door middel van voedingsinterventies. **In tegenstelling tot deze studies naar respiratoire aandoeningen richt onze studie zich niet op behandeling middels**

**Datum**

22 september 2015

**Onze referentie**

AVD501002015235

**E-mail**

[REDACTED]

**Doorkiesnummer**

[REDACTED]

**Bijlage(n)**

2

**Kopie aan**

[REDACTED]

Op opdrachten aan TNO zijn de Algemene Voorwaarden voor opdrachten aan TNO, zoals gedeponeerd bij de Griffie van de Rechtbank Den Haag en de Kamer van Koophandel Den Haag van toepassing. Deze algemene voorwaarden kunt u tevens vinden op [www.tno.nl](http://www.tno.nl).  
Op verzoek zenden wij u deze toe.

Handelsregisternummer 27376655.

**Datum**  
22 september 2015

**Onze referentie**  
AVD501002015235

**Blad**  
2/2

antibiotica, maar juist op de veel minder invasieve methode van voedingsinterventie. De wijze van monsternamen in de hier voorgestelde studies is vrijwel niet invasief (neusswab, feces). Wanneer bepalingen in bloed nodig zijn worden deze uitgevoerd op monsters, die ten behoeve van de reguliere monsternamen in opfokbedrijven nodig is. Aldus wordt maximaal aan verfijning in te gebruiken technieken gedaan.

Wij hopen dat wij hiermee de vragen van de CCD naar tevredenheid hebben beantwoord.

Hoogachtend



A large black rectangular redaction covers the signature area. A small blue handwritten mark is visible to the left of the redaction.

## 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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

#### 1 Algemene gegevens

- 1.1 Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.
- 1.2 Vul de naam van de instelling of organisatie in.
- 1.3 Vul het volgnummer en het type dierproef in.
- | Volgnummer | Type dierproef  |
|------------|---|
| 1          | Het nemen van neusholte samples ter identificatie van de microbiële samenstelling van het nasopharyngeaal microbioom. |
- 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 studie is het onderzoeken of door middel van voedingsinterventies en toediening van neussprays, het mogelijk is om het nasopharyngeaal microbioom te beïnvloeden en daarmee een positief effect op de respiratoire gezondheid van vleeskalveren te bereiken. Door de wijze waarop vleeskalveren worden gemest, is het goed mogelijk om individuele voedingsinterventies uit te voeren binnen de kaders en richtlijnen van de reguliere vleeskalverhouderij. Er is voor deze studie daarom gekozen om gebruik te maken van reguliere vleeskalveren zodat de proefdiersoort gelijk is aan de diersoort waar de interventie voor bedoeld is. Omdat de respiratoire gezondheid een directe weerslag op de algemene gezondheid van de kalveren heeft, zal de algehele gezondheid van de vleeskalveren worden gemonitord volgens de normale richtlijnen voor vleeskalveren. Daarnaast zal ook de samenstelling van het nasopharyngeaal microbioom worden bepaald. Hiervoor zullen nasopharyngeale swabs worden genomen van de kalveren. Uit die swabs wordt DNA geëxtraheerd waarna de microbiële

samenstelling bepaald wordt door middel van 16S amplicon sequencing (een methode waarbij de bacteriële diversiteit van een sample bepaald wordt door het uitlezen van de in dat sample aanwezige 'barcodes', de ribosomale 16S sequenties). Omdat darmgezondheid ook veel in verband wordt gebracht met gezondheid en er voedingsadditieven worden gebruikt die uiteindelijk ook in de darm terecht komen, zullen ook fecale swabs worden genomen die eveneens door middel van 16S amplicon sequencing geanalyseerd zullen worden. De algehele gezondheidsparameters en de samenstelling van het nasopharyngeale microbioom worden vervolgens gekoppeld om een eventueel verband tussen voedingsinterventies of het toedienen van neussprays, de samenstelling van het nasopharyngeale en darm microbioom en de algehele gezondheid van de kalveren te bepalen.

---

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.

Een representatief voorbeeld van de proefopzet is de planning voor het eerste experiment.

In deze eerste proef zullen tweehonderd (200) kalveren worden gehuisvest in vijf groepen, verdeeld over vier gescheiden afdelingen.

De kalveren worden onder reguliere omstandigheden op een regulier vleeskalverbedrijf gehuisvest. In vervollexperimenten zou kunnen worden uitgeweken naar andere reguliere vleeskalverhouderijen. Een ander bedrijf zou gevolgen kunnen hebben op het aantal dieren en de indeling van de dieren in afdelingen. Op het bedrijf waar de eerste proef plaats zal vinden en tevens op elk ander bedrijf wat gebruikt zou kunnen worden, worden de voorschriften volgens de regeling 'IKB vleeskalveren' nageleefd. De IKB regeling (<http://www.ikbvleeskalveren.nl/site/Vleeskalveren-blank/IKB-regeling/9>) is het kwaliteitsbeheersingssysteem van de Nederlandse kalverhouderij en omvat eisen die strenger zijn dan de wettelijke eisen voor huisvesting van vleeskalveren. Elke groep krijgt naast gemeen ruw voer een eigen melk gebaseerde en per dier individueel toegediende voeding, al dan niet aangevuld met een dagelijks toegediende neusspray bestaande uit een bacteriecultuur of een mix van etherische oliën. De variaties in het individueel toegediende voer bestaan uit variaties van geregistreerde en toegelaten voedingsadditieven. De verschillende kalvergroepen zullen worden gevolgd in de tijd door de standaard metingen die gebruikelijk zijn in de reguliere kalverhouderij (wegingen, diarreescore, verteringscore, bloedanalyse, bijhouden van eventuele uitval en individuele veterinaire handelingen). De melk gebaseerde voeding met de variaties aan voedingsadditieven wordt individueel toegediend waardoor het mogelijk is om overgebleven voer terug te wegen en de intake per dier additief te bepalen. Van belang voor deze projectaanvraag is dat daarnaast ook maximaal 7 nasopharyngeale en fecale swabs van elk dier worden afgenomen gedurende een periode van 27 weken op het mestbedrijf voor het bepalen van de nasopharyngeale en fecale microbiomsamenstelling. Het nemen van de nasopharyngeale swabs vindt plaats door de swab via de neus in te brengen tot de nasopharyngeale holte, wat inhoudt dat de swab ongeveer tot een diepte ter hoogte van het oog wordt ingebracht. Voor het nemen van fecale swabs is een diepe penetratie niet noodzakelijk. Alle samples voor de dierproef zullen worden genomen door bevoegd en getraind personeel wat in eerdere studies heeft bewezen de samples te kunnen nemen met minimale impact op de dieren.

In eventuele vervollexperimenten zal de indeling in groepen kunnen afwijken van bovenstaand schema, samples zullen echter op vergelijkbare wijze en frequentie worden genomen en geanalyseerd.

Het effect van de verschillende voedingsadditieven en neussprays zal worden bepaald aan de hand van de algehele gezondheid van de kalveren en de samenstelling van het fecale microbioom, maar met name het nasopharyngeale microbioom. De algehele gezondheid zal worden beoordeeld door de behandelende dierenarts en het verzorgend personeel aan de hand van de standaard parameters (Gewicht, diarree, vertering, en veterinaire behandelingen. Uitval zal ook worden bijgehouden, maar dit zal niet als uitlees-parameter worden gehanteerd). Daarnaast zal ook de uitlezing van de microbiota, met name het nasopharyngeale microbioom een beeld geven van de gezondheid van de kalveren. Beide metingen zullen worden gecombineerd om een verband tussen voedingsinterventies, gezondheid en het nasopharyngeale microbioom te identificeren.

---

Als er kalveren ziek worden zal de behandelend dierenarts besluiten tot behandeling van zieke dieren conform de normale aanpak binnen de kalverhouderij.

Dit houdt in dat afhankelijk van de symptomen, verschillende behandelingen mogelijk zijn, zoals bijvoorbeeld het toedienen van aspirine tegen koorts, extra vitamine C om de weerstand te verbeteren, lijnzaadolie om de vertering te verbeteren, of het toedienen van antibiotica. Behandeling van zieke dieren is onderdeel van de reguliere veehouderij en vormt dus géén onderdeel van deze dierproef. De reden om deze informatie hier toe te voegen is dat het gebruik van antibiotica invloed kan hebben op de onderzochte parameters. Afhankelijk van het aantal zieke dieren per testgroep (elke testgroep wordt beschouwd als een apart koppel) wordt besloten om alleen de zieke dieren te behandelen of de gehele testgroep. In eerste instantie worden alleen individuele dieren behandeld, tenzij 10% van de testgroep in vijf voorafgaande dagen is behandeld of er 4% ziekteverval is in de laatste 24 uur, in dat geval wordt de gehele testgroep behandeld met antibiotica.

---

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

Eerder werk heeft uitgewezen dat het uitlezen van het nasopharyngeale microbioom bij 15 dieren per bedrijf op 8 bedrijven, aangevuld met 30 fokkalveren op 1 bedrijf, voldoende informatie oplevert voor een goede uitlezing van de microbiële dynamiek in de nasopharynx. In het huidige experiment wordt gekeken naar het nasopharyngeale microbioom in relatie tot algehele gezondheid en groei van de vleeskalveren. De beoordeling van de gezondheid en kwaliteit van vleeskalveren en daarmee het effect van de interventies in deze studie vindt plaats op basis van meerdere parameters die standaard in de praktijk worden gemeten (individuele veterinaire behandelingen, verteringsscore, voedingsconversie en geslacht gewicht). Eerdere ervaringen van de betrokken kalverhouderij hebben uitgewezen dat de benodigde groepsgrootte voor een significante uitlezing van deze parameters ( $\Delta x = 2; 1,5; 0,1; 6$ , respectievelijk) varieert van 31-42 dieren. Vanwege de beschikbare ruimte in de stal (ruimte voor 200 kalveren) is besloten om voor de eerste proef gebruik te maken van 5 groepen van 40 dieren elk. In latere experimenten zal een vergelijkbare groepsgrootte worden gehanteerd.

Per experiment zijn twee controlegroepen inbegrepen om een goede vergelijking te kunnen doen: een controlegroep die standaard voer krijgt wat gebruikt wordt in de reguliere kalverhouderij (de basis controle) en een controlegroep die een rijk dieet krijgt waarvan bekend is dat het een positief effect heeft op de groei en gezondheid van de kalveren, maar te duur is voor standaard gebruik in de praktijk (positieve controle). Naast de controlegroepen worden ook testgroepen meegenomen, het exacte aantal hiervan hangt af van de hoeveelheid te testen additieven en de beschikbare ruimte op het proefbedrijf. In de eerstvolgende studie worden drie testgroepen meegenomen. Vanwege de beschikbare ruimte (ruimte voor 200 kalveren) in de stal van het proefbedrijf waar de eerste proef gepland is, is besloten om gebruik te maken van 5 groepen van 40 dieren elk.

De verdeling van de dieren over de testgroepen gebeurt door de dieren bij binnenkomst op het proefbedrijf random te verdelen over de testgroepen. De ervaring van de betrokken kalverhouderij is dat het effect van het melkveebedrijf van de kalveren sterker is dan het effect van het opvangcentrum en transport. Daarom is er besloten geen gebruik te maken van een block design bij de indeling van de kalveren over de stal. Voorafgaand aan het experiment kan er nog een herverdeling van de dieren plaatsvinden op basis van het opzetgewicht en het Hb-gehalte zodat de testgroepen zo evenredig mogelijk verdeeld zijn over de groepen.

De indeling in de drie testgroepen voor de eerste proef is gebaseerd op de aard van de additieven (1: twee op melk gebaseerde componenten, 2: vijf additieven zoals bijv. prebiotica in combinatie met een neusspray van een bacteriecultuur, en 3: een mix van etherische oliën, zowel toegediend via de melk als via een neusspray). Afhankelijk van de resultaten zal voor latere proeven besloten worden welke groep(en) van ingrediënten verder onderzocht zal/zullen worden door de additieven uit te splitsen en/of te combineren of op andere wijze te optimaliseren. Hierbij kan gedacht worden aan optimale dosering, de optimale periode waarin de interventie wordt gegeven en de optimale toedieningsroute in praktijksituaties.

Uitval van vleeskalveren komt in vrijwel elke mestperiode voor en lijkt grotendeels afhankelijk van de oorsprong van de kalveren. Door de milde aard van de handelingen binnen de dierproef is niet te verwachten dat deze interventies voor een hogere uitval zorgen. Gebaseerd op eerdere ervaringen (van de betrokken kalverhouderij) is het verwachte uitvalspercentage ~5%, waardoor niet wordt verwacht dat normale uitval tot problemen gaat leiden voor de groepsgrootte.

## B. De dieren

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

De proefdiersoort is gelijk aan de diersoort waar de maatregelen uiteindelijk voor bedoeld zijn: reguliere vleeskalveren. De dieren in deze studie zijn standaard stierkalveren die afkomstig zijn van verschillende melkveebedrijven. De exacte oorsprong en ras is op moment van aanvraag nog niet bekend, dit is afhankelijk van de beschikbaarheid van kalveren op de aangesloten bedrijven. Er is gekozen voor het gebruik van stierkalveren omdat deze de bulk vormen van de gebruikte vleeskalveren. Hoewel dit afwijkt van de praktijk, waar een klein deel (max. 15%) van de vleeskalveren bestaat uit vaarskalveren, is er gekozen om alleen stierkalveren te gebruiken binnen deze studie om de variatie zo klein mogelijk te houden en daarmee het benodigde aantal dieren zo laag mogelijk te houden. Vaarskalveren die onder normale omstandigheden op dit bedrijf terecht zouden komen, worden nu verspreid over andere praktijk bedrijven en blijven dus niet over, maar volgen het normale mest-regime. De kalveren komen op een leeftijd van 2-3 weken aan op het bedrijf waar de dieren gedurende deze studie gehuisvest worden. Bij aankomst zullen de dieren random verdeeld worden over de verschillende proefgroepen zoals beschreven in sectie 'A' van deze bijlage. Gemeten vanaf het moment van aankomst zullen de kalveren gedurende een periode van 27 weken op dit bedrijf gehuisvest worden, waarna de normale slachtprocedure gevolgd zal worden.

Vanwege de looptijd van één studie (ongeveer een half jaar) en de bijbehorende voorbereidingen en uitwerkingen, wordt geschat dat per jaar een gemiddelde van 1 tot 1,5 studies kan worden uitgevoerd. Om de vervolgvragen omtrent de gehele studie te kunnen beantwoorden, wordt geschat dat er 6-8 studies noodzakelijk zijn. Dit zou de maximale projectperiode van 5 jaar kunnen overschrijden. Voor de eerste 5 jaar van dit project schatten wij derhalve in ongeveer 1200 (het equivalent van 6 studies) kalveren te gebruiken.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Vanwege de complexe interactie tussen gastheer en microbiota is onderzoek in een vleeskalf noodzakelijk. De kalveren die in deze studie worden meegenomen, volgen een normaal mestschema en zullen na afloop hiervan worden geslacht, net als reguliere vleeskalveren die geen onderdeel zijn van deze studie. Er worden dus géén dieren specifiek voor het uitvoeren van deze studie gebruikt, waardoor optimaal aan vermindering wordt gedaan.

De betrokken partij uit de vleeskalverenindustrie is zeer goed thuis in het werk wat is uitgevoerd aan kalvergezondheid. De reden voor de aangevraagde studie is het gebrek aan kennis op het gebied van studies naar verbeterde respiratoire gezondheid bij deze partij. Een literatuurstudie laat zien dat er zeer weinig literatuur beschikbaar is over respiratoire gezondheid van kalveren. De literatuur die wel beschikbaar is, is gericht op respiratoire aandoeningen in kalveren (zie bijv. het proefschrift van Bart Pardon, 2012, Universiteit van Gent) maar niet op het verbeteren van respiratoire gezondheid van kalveren door

middel van voedingsinterventies. In tegenstelling tot deze studies naar respiratoire aandoeningen richt onze studie zich niet op behandeling middels antibiotica, maar juist op de veel minder invasieve methode van voedingsinterventie. De wijze van monsternamen in de hier voorgestelde studies is vrijwel niet invasief (neusswab, feces). Wanneer bepalingen in bloed nodig zijn worden deze uitgevoerd op monsters, die ten behoeve van de reguliere monsternamen in opfokbedrijven nodig is. Aldus wordt maximaal aan verfijning in te gebruiken technieken gedaan.

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 nemen van de diepe neus (nasopharyngeale) swabs resulteert in minimaal ongerief bij de kalveren en worden bovendien uitgevoerd door bevoegd en goed opgeleid personeel met veel ervaring op dit gebied. Hetzelfde personeel neemt ook de fecale swabs, wat door de minimale invasieve handeling nog minder ongerief veroorzaakt bij de dieren.

## 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.

Bij de betrokken kalverhouderij is geen kennis van vergelijkbare dierproeven die zijn uitgevoerd in de sector. Het enige bekende werk is het eerdere, preliminair onderzoek naar het effect van de additieven en neussprays waarbij nu wordt gezocht naar een link met het nasopharyngeaal microbiom en gezondheid

## 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.

Vanwege de opzet van de studie in een praktijk setting (een regulier vleeskalverenbedrijf wat is aangesloten bij SKV), worden de dieren gehuisvest en behandeld als alle reguliere vleeskalveren zoals vastgelegd in de regeling IKB vleeskalveren, welke strengere eisen heeft ten aanzien van huisvesting en behandeling dan de wettelijk verplichte regels.

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

Dit betreft een commercieel praktijkbedrijf voor vleeskalveren.

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

Het gekozen proefbedrijf is aangesloten bij SKV en voldoet aan de eisen van de regeling IKB vleeskalveren en voldoet daarmee ruim aan alle wettelijke eisen voor huisvesting en behandeling. Historisch gezien is dit proefbedrijf een bedrijf wat laag zit in het aandeel afgekeurd vlees, lever en nieren, wat een



indicatie is voor goede zorg van de dieren. De dierproefhandelingen worden uitgevoerd door bevoegd personeel met veel ervaring op dit gebied.  
Als extra controle op de respiratoire gezondheid van de dieren zal bij de slacht (dus ná afloop van de dierproef) gelet worden op de kwaliteit van de longen.

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De dieren worden gehuisvest en behandeld als elk ander vleeskalf. Andere vormen van welzijnsaantasting dan het nemen van de nasopharyngeale swabs of het nemen van fecale swabs worden in het kader van dit project daarom niet voorzien.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Niet van toepassing.

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

Niet van toepassing

### 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.

Indien er volgens de behandelend dierenarts sprake is van ondraaglijk leed of sprake is van een uitzichtloze situatie kan de behandelend dierenarts besluiten tot euthanasie van het betreffende dier. Dit zal verlopen zoals bij elk ander regulier vleeskalver bedrijf. De verwachting is dat de dierproef geen invloed zal hebben op het aantal dieren waarop euthanasie gepleegd zal moeten worden.

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

Op basis van historische ervaringen binnen dit bedrijf is de verwachting dat een totaal van ~5% van de dieren gedurende de looptijd van het experiment zal uitvallen. Hierbij dient aangetekend te worden dat wellicht niet al deze dieren geëuthaniseerd zullen worden, een gedeelte zal ook zonder menselijk ingrijpen kunnen overlijden.

De behandelend dierenarts zal indien mogelijk, altijd voor kiezen om een ziek dier te behandelen volgens de normale praktijk behandelingen, euthanasie is slechts de laatste uitweg. Het welzijn van de dieren zal worden geborgd als elk ander vleeskalf dat wordt gemest op een bedrijf welke voldoet aan de IKB certificering.

#### **K. Classificatie van ongerief**

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Het ongerief van de dieren wordt geclassificeerd als 'licht' door het diepe inbrengen van swabs via de neus om de nasopharyngeale monsters te kunnen nemen. Het nemen van fecale swabs resulteert in zulk minimaal ongerief dat dit ongerief wegvalt bij het nemen van de nasopharyngeale swabs.

### **Einde experiment**

#### **L. Wijze van doden**

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

Nee > Ga verder met de ondertekening.

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

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Organisatie TNO

Postbus 96800  
2509 JE DEN HAAG  


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

Onze referentie  
Aanvraagnummer  
AVD501002015235  
Bijlagen  
2

Datum 01-09-2015  
Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 1 september 2015

Vervaldatum: 1 oktober 2015

Factuurnummer: 201570235 / 31001174481

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvegrunning dierproeven Betreft aanvraag AVD501002015235	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

TNO

Postbus 96800

2509 JE DEN HAAG



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD501002015235

12 OKT 2015

Datum

Betreft Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 1 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Bevorderen respiratoire gezondheid van vleeskalveren" met aanvraagnummer AVD501002015235. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 24 september 2015 heeft u uw aanvraag aangevuld. Dit betrof aanpassing van de NTS en uitwerking van de 3 V's.

### **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 betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld bij vergunningen met een langere looptijd. Dit om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Bevorderen respiratoire gezondheid van vleeskalveren" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 november 2015 tot en met 31 oktober 2020.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-TNO gevoegd. Dit advies is opgesteld op 1 september 2015. 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. De CCD stelt wel algemene voorwaarden aan dit project. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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

## Projectvergunning

### gelet op artikel 10a van de Wet op de Dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: TNO  
Adres: Postbus 96800  
Postcode en plaats: 2509 JE DEN HAAG  
Deelnemersnummer: 50100

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 november 2015 tot en met 31 oktober 2020, voor het project "Bevorderen respiratoire gezondheid van vleeskalveren" met aanvraagnummer AVD501002015235, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-TNO.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 1 september 2015
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 1 september 2015;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 24 september 2015;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 1 september 2015, ontvangen op 1 september 2015.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 24 september 2015

Naam proef	Diersoort/ Stam	Aantal dieren	Ernst	Opmerkingen
Het nemen van neusholte samples ter identificatie van de microbiële samenstelling van het nasopharyngeaal microbiom	Runderen (Bos taurus) / reguliere (stier)vleeskalveren, 2-3 weken oud	1200	Licht / mild	

### Voorwaarden

**Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wod zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen**

De onderzoeker dient bij elk onderzoek de onderbouwing van de keuze van de te gebruiken voedingsadditieven en of neussprays

aan de IvD voor te leggen.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

# Weergave wet- en regelgeving

## **Dit project en wijzigingen**

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

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

#### **Locatie**

De vergunning wordt verleend voor een project waarbij dierproeven geheel of gedeeltelijk worden verricht buiten een inrichting van een gebruiker (artikel 10g van de wet).

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** vrijdag 16 oktober 2015 11:00  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD501002015235

Geachte DEC-TNO,

Op 1 september 2015 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project "Bevorderen respiratoire gezondheid van vleeskalveren" met aanvraagnummer AVD501002015235.

De CCD heeft de aanvrager aanvullende vragen gesteld.

Dit betrof de NTS, m.b.t. moeilijke woorden (zoals pathogene micro-organismen; IKB regeling; samplen), het aantal dieren (hier stond 'ongeveer', maar er moet een exact, eventueel maximum, aantal genoemd worden) en het ongerief was niet geassocieerd in lucht, matig, ernstig of terminaal.

Daarnaast stond in de Beschrijving Dierproeven bij Vervanging, vermindering en verfijning dat er literatuuronderzoek is gedaan. Er is verzocht meer in te gaan op de vervanging, vermindering en verfijning.

De CCD heeft besloten de vergunning te wijzen. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

De vergunning wordt verleend onder de volgende voorwaarden:

De onderzoeker dient bij elk onderzoek de onderbouwing van de keuze van de te gebruiken voedingsadditieven en of neussprays aan de IvD voor te leggen.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is.

Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

Als er nog vragen zijn, dan hoor ik dat graag.

**Let op: vanaf nu heeft de CCD een nieuw e-mailadres [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl). Heeft u ons oude e-mail adres in uw adressenboek, dan vragen we u om dat aan te passen.**

Met vriendelijke groeten,  
**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 – 28 000 28 (10 ct/min)

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

Inventaris Wob-verzoek W16-07S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2015236</b>								
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	Bijlage beschrijving dierproeven 4			x					
8	Bijlage beschrijving dierproeven 5			x					
9	Bijlage beschrijving dierproeven 6			x					
10	DEC-advies				x		x	x	
11	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
12	Mail vraag en antwoord 5-10-2015				x		x	x	
13	Advies CCD		x						x
14	Beschikking en vergunning				x		x	x	
15	Mail beschikking 14-10-2015				x		x	x	



AVD 104002015236

## 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](http://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	10400
		<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	Wageningen University
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	9215846
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	Akkermaalsbos 12
		Postbus	59
		Postcode en plaats	6700 AB Wageningen
		IBAN	NL10 RABO 0397066465
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Wageningen UR
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	<input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	
		Afdeling	
		Telefoonnummer	
		E-mailadres	

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |                |
|------------|----------------|
| Startdatum | 1 - 12 - 2015  |
| Einddatum  | 30 - 11 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- De rol van specifieke genen en signaalroutes in het energiemetabolisme en de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme.
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De rol van bepaalde genen in het energiemetabolisme
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                                  |
|-------------|----------------------------------|
| Naam DEC    | DEC-WU                           |
| Postadres   | Postbus 9191, 6700 HB Wageningen |
| E-mailadres |                                  |

## 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 + 6 bijlagen
- Niet-technische samenvatting
- DEC-advies
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging + mandaat besluit
- Bestelorder WUR 888369

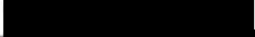
## 6 Ondertekening

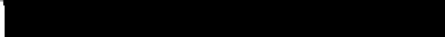
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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

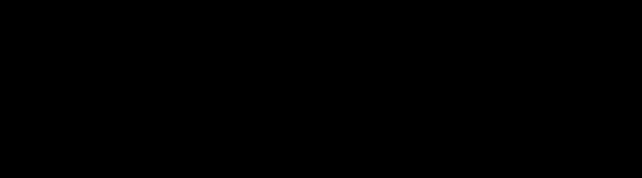
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan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

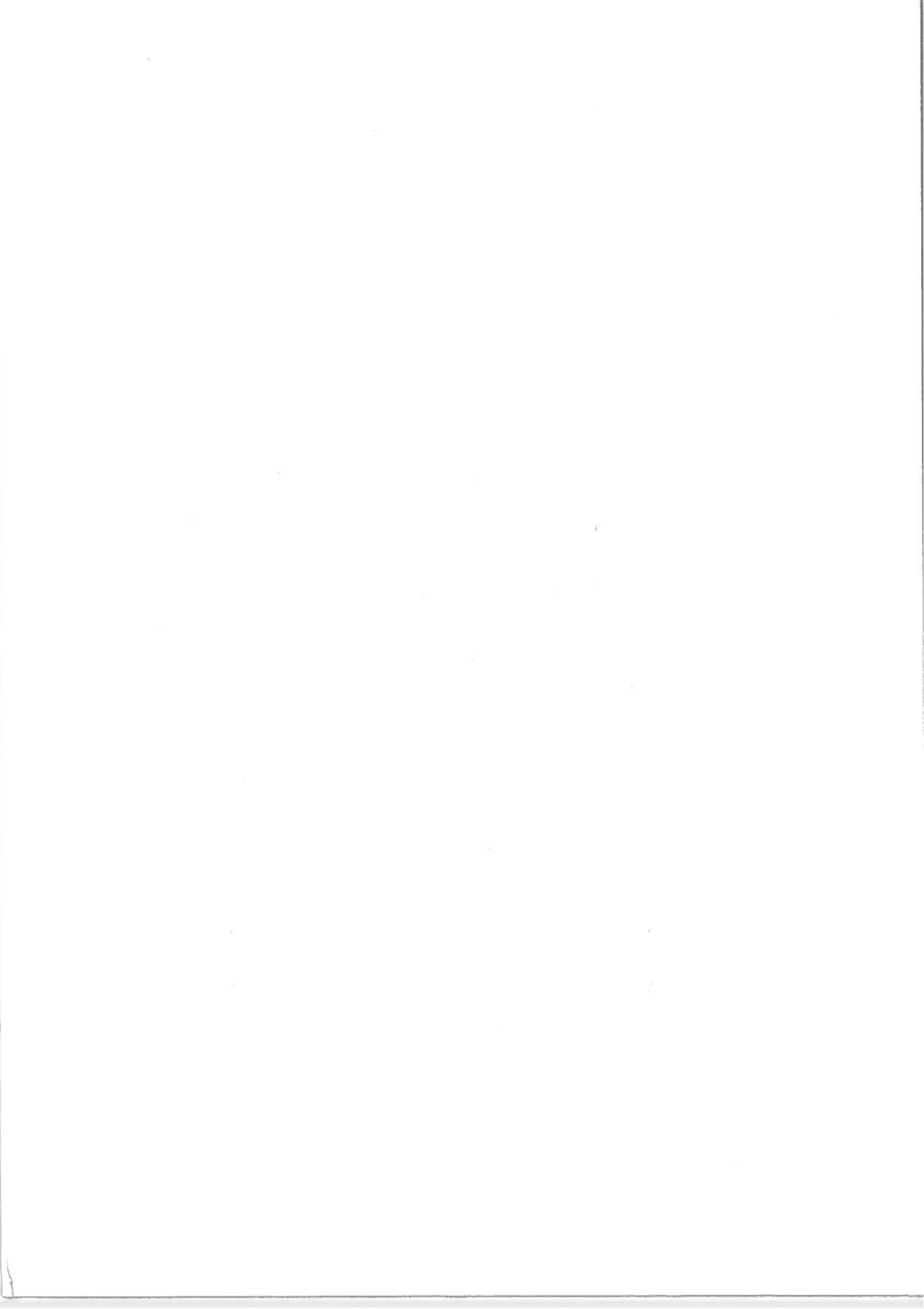
Naam 

Functie 

Plaats Wageningen

Datum 7 - 9 - 2015

Handtekening 





## Format Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://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.  Fundamenteel onderzoek
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de
- 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.

Welvaartsziekten zoals obesitas, diabetes, niet-alcoholische vette lever ziekte (NAFLD, omvat een spectrum aan leverziekten, namelijk van steatose tot niet-alcoholische steatohepatitis, fibrose en cirrose), en hart- en vaatziekten zijn verantwoordelijk voor een groot aantal ziekte- en sterftegevallen. Dit aantal kan middels betere preventie en geneeskundige behandeling aanzienlijk naar beneden worden gebracht. Obesitas, diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten hebben hun primaire oorsprong in verstoringen van het energiemetabolisme. Daarnaast spelen veranderingen in het immuunsysteem een belangrijke rol bij de ontwikkeling van deze ziekten. De laatste decennia is aangetoond dat het immuunsysteem en het energiemetabolisme nauw met elkaar verweven zijn. Zo hebben diverse hormonen een rol in zowel het immuunsysteem als het energiemetabolisme. Een ander voorbeeld van de koppeling tussen het energiemetabolisme en het immuunsysteem is de overmatige opname van cholesterol door immuuncellen in de vaatwand tijdens de ontwikkeling van hart- en vaatziekten. Zowel het energiemetabolisme als het immuunsysteem bieden aldus aangrijpingspunten voor de verbeterde preventie en behandeling van obesitas, diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten.

Veranderingen in levensstijl zoals verhoogde fysieke activiteit en aanpassing van de voeding vormen de basis voor de *preventie* van bovengenoemde stoornissen. Door deze veranderingen in levensstijl wordt het energiemetabolisme verbeterd. Een gezonde levensstijl is echter geen garantie dat mensen geen last krijgen van obesitas, diabetes, NAFLD, en hart- en vaatziekten. Voor de *behandeling* van diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten zijn veranderingen in levensstijl vaak onvoldoende effectief en/of nog lastig te implementeren, waardoor therapeutische benaderingen zoals gebruik van medicijnen onvermijdelijk zijn en nog vaak de voorkeur krijgen.

Om nieuwe therapieën voor deze welvaartsziekten te kunnen ontwikkelen is het belangrijk om te begrijpen hoe onze stofwisseling precies functioneert en wordt gereguleerd, en te analyseren wat er precies misgaat bij obesitas, diabetes, NAFLD, en hart- en vaatziekten.

Het hier beschreven project richt zich op de rol van specifieke genen en signaalroutes in het energiemetabolisme en de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme. Tevens willen we de rol van deze genen en signaalroutes bij de ontwikkeling van obesitas, diabetes, NAFLD, en hart- en vaatziekten ophelderen.

Binnen het project ligt de nadruk op de volgende genen en/of signaalroutes:

- a) Genen die betrokken zijn bij de verwerking van vet in de cel. De ophoping van vet in diverse cellen speelt een cruciale rol bij de ontwikkeling van obesitas, diabetes, NAFLD, en hart- en vaatziekten. Het gaat hierbij om genen die gereguleerd worden door de zogenaamde PPAR factoren.
- b) Signaalroutes die betrokken zijn bij de interactie tussen immuuncellen en vetcellen. Tijdens de ontwikkeling van obesitas dringen diverse immuuncellen, waaronder macrofagen, het vetweefsel binnen. Deze immuuncellen veroorzaken een chronische ontsteking die mogelijk bijdraagt aan de ontwikkeling van diabetes en hart- en vaatziekten.
- c) Signaalroutes die worden geactiveerd door verandering van de samenstelling van de microbiota (bacteriën) in de darm. Er is een toenemend aantal aanwijzingen dat de bacteriën in ons darmkanaal een rol spelen in de ontwikkeling van obesitas, diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten. De samenstelling van de darmbacteriën kan worden

veranderd door aan het voer specifieke voedingsvezels toe te voegen. Daarnaast kan met behulp van antibiotica de darmbacteriën worden onderdrukt om zo te onderzoeken of darmbacteriën bijdragen aan de ontwikkeling van obesitas, diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten.

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Het algemene doel van de proef is om beter inzicht te krijgen in de regulatie van het energiemetabolisme en het immuunsysteem tijdens gezondheid en (metabole) ziekten. Het project richt zich daarbij op de onderliggende mechanismen. De specifieke doelstelling van het project is om de fysiologische functie van specifieke genen en/of signaalroutes in het energiemetabolisme en het immuunsysteem op te helderen, en een mogelijke rol van deze genen en signaalroutes bij de ontwikkeling van obesitas, diabetes, NAFLD, en hart en vaatziekten bloot te leggen. Uiteindelijk willen we de regulatie van het energiemetabolisme en het immuunsysteem beter in kaart brengen en nieuwe mogelijke aangrijpingspunten vinden voor de behandeling van metabole stoornissen zoals diabetes, NAFLD, en hart en vaatziekten, op grond van diepgaande kennis van de moleculaire processen die bij bovengenoemde ziekten verstoord zijn.

Vrijwel alle experimentele technieken en handelingen die in de verschillende onderdelen van dit project zijn beschreven zijn al eerder uitgevoerd binnen de onderzoeksgroep. Er is inmiddels veel ervaring met deze (be)handelingen.

### 3.3 Belang

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

De behandeling van hart- en vaatziekten is de laatste decennia flink verbeterd. Desondanks zijn hart- en vaatziekten, samen met kanker, nog steeds doodsoorzaak nummer 1 in vele Westerse landen. Het aantal patiënten met diabetes en NAFLD zal naar verwachting sterk toenemen, vooral als gevolg van het groeiend aantal mensen dat worstelt met (ernstig) overgewicht. Zowel diabetes en NAFLD zijn chronische ziekten die kunnen leiden tot een aantal ernstige co-morbiditeiten, waaronder neuropathie en blindheid, steatohepatitis, en leverfibrose. Daarnaast zijn diabetes en NAFLD hele belangrijke risicofactoren voor hart- en vaatziekten. Diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten worden primair veroorzaakt door verstoringen van het energiemetabolisme. Veranderingen in levensstijl zoals verhoogde fysieke activiteit en aanpassing van de voeding vormen de basis voor de *preventie* van bovengenoemde ziekten. Door deze veranderingen in levensstijl wordt het energiemetabolisme verbeterd. Voor de *behandeling* van diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten zijn veranderingen in levensstijl vaak onvoldoende effectief en/of nog lastig te implementeren, waardoor therapeutische benaderingen zoals gebruik van medicijnen onvermijdelijk zijn en nog vaak de voorkeur krijgen. Om verdere stappen te kunnen maken in de behandeling van diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten, zowel qua preventie via veranderingen in levensstijl alsmede via behandeling met medicijnen, is het belangrijk dat er meer inzicht wordt verkregen in hoe ons metabolisme werkt en wordt gereguleerd en tevens welke specifieke metabole signaalroutes ontspreken bij bovengenoemde ziekten. Ons project heeft daarbij niet zozeer een translationeel karakter en hanteert de muis niet als diermodel om concrete behandelingen te testen maar richt zich veeleer op de onderliggende mechanismen. De vraagstellingen zijn dus primair fundamenteel van aard met relevantie voor de metabole ziekten obesitas, diabetes,

NAFLD en hart- en vaatziekten.

Op basis van meerdere strategieën hebben wij een aantal genen en signaalroutes geïdentificeerd met een mogelijke rol in de ontwikkeling van bovengenoemde welvaartsziekten. Op dit moment is er echter nog relatief weinig bekend over de rol van de hier te bestuderen genen en signaalroutes in het energiemetabolisme en het immuunsysteem, alsmede in de interactie tussen het energiemetabolisme en het immuunsysteem. We hebben echter goede aanwijzingen vanuit de literatuur en voorwerk binnen onze onderzoeksgroep die de aandacht op deze genen en signaalroutes rechtvaardigt.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

De algemene strategie van het project is om de rol van specifieke genen en/of signaalroutes in het energiemetabolisme en het immuunsysteem bloot te leggen door gebruik te maken van specifieke muizenmodellen waarbij het gen of de signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd. Om genen of signaalroutes te activeren zal gebruik worden gemaakt van transgene muizen of muizen die behandeld worden met een adeno(-associated) virus. Om genen of signaalroutes te inactiveren zal gebruik worden gemaakt van knock-out muizen of muizen die behandeld worden met een adeno(-associated) virus.

Veel genen en signaalroutes worden vooral relevant wanneer een organisme wordt blootgesteld aan omstandigheden waarbij het metabolisme op de proef wordt gesteld. Voorbeelden zijn fysieke inspanning, koude, ondervoeding en overvoeding. Maar ook een infectie of behandeling met medicijnen kan het metabolisme extra belasten. Om de rol van specifieke genen of signaalroutes op te helderen zullen muizen waarin deze specifieke genen of signaalroutes zijn geactiveerd of geïnactiveerd worden onderworpen aan één van een vijftal mogelijke belastingen. Dit vijftal mogelijke belastingen vertegenwoordigen de eerste vijf typen dierexperimenten die in dit voorstel beschreven staan. Het zesde type dierexperiment omvat het vervaardigen van specifieke muizenmodellen waarbij een gen of signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd.

Voor de proeven zal om praktische redenen gebruik worden gemaakt van mannelijke muizen. Het beoogde onderzoek en de fundamentele vraagstellingen die daarin gesteld worden spelen zich af op een niveau waarbij het geslacht naar verwachting een minimale of geen invloed heeft op de onderzoeksresultaten. We verwachten om die reden dat de resultaten van de dierproeven gelijkwaardig vertaalbaar zijn naar vrouwen en mannen.

Binnen het project willen we de rol van de volgende genen en/of signaalroutes onderzoeken:

- a) Genen die betrokken zijn bij de verwerking van vet in de cel. De ophoping van vet in diverse cellen speelt een cruciale rol bij de ontwikkeling van obesitas, diabetes, NAFLD, en hart- en vaatziekten. Het gaat hierbij om genen die gereguleerd worden door de zogenaamde PPAR factoren.
- b) Signaalroutes die betrokken zijn bij de interactie tussen immuuncellen en vetcellen. Tijdens de ontwikkeling van obesitas dringen diverse immuuncellen waaronder macrofagen het vetweefsel binnen. Deze immuuncellen veroorzaken een chronische ontsteking die mogelijk bijdraagt aan de ontwikkeling van diabetes en hart- en vaatziekten.
- c) Signaalroutes die worden geactiveerd door verandering van de samenstelling van de

microbiota (bacteriën) in de darm. Er zijn toenemende aanwijzingen dat de bacteriën in ons darmstelsel een rol spelen in de ontwikkeling van obesitas, diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten. De samenstelling van de darmbacteriën kan worden veranderd door aan het voer specifieke voedingsvezels toe te voegen. Daarnaast kan met behulp van antibiotica de darmbacteriën worden onderdrukt om zo te onderzoeken of darmbacteriën bijdragen aan de ontwikkeling van obesitas, diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten.

In totaal zullen maximaal 25 genen en/of signaalroutes onderzocht worden.

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

Deze projectaanvraag bestaat uit verschillende onderdelen. Elk onderdeel beschrijft een bepaald type dierexperiment waarbij muizen aan een bepaalde belasting wordt onderworpen om het energiemetabolisme op de proef te stellen. Deze verschillende typen belastingen ("stressors") zullen worden uitgevoerd met muizen waarin specifieke genen en/of signaalroutes zijn geactiveerd of geïnactiveerd. Afhankelijk van de vermoede functie van het gen en/of signaalroute zal voor één van de vijf typen experimenten gekozen worden (zie 3.4.3).

Een separaat onderdeel bestaat uit het vervaardigen van muizen waarin een bepaald gen of signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd (volgnummer 1).

- 2) Hoogvetdieet. Dit experimentele model omvat het geven aan muizen van een voer dat verrijkt is met vet (45-60 energieprocent), waarbij eventueel nog andere componenten in de voeding zoals vezel, mineralen, of een bepaalde metaboliet worden gemoduleerd. Dit experimenteel model leidt tot de ontwikkeling van overgewicht, NAFLD en insuline-ongevoeligheid bij muizen. Hierbij speelt het immuunsysteem een belangrijke rol. Door muizen waarin een bepaald gen of bepaalde signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd een voer te geven dat verrijkt is met vet kan de rol van dit gen of signaalroute bij het energiemetabolisme en bij bovengenoemde ziekten zichtbaar gemaakt worden.
- 3) Vasten. Dit experimentele model omvat het onthouden van muizen van voer gedurende maximaal 24 uur. Vasten leidt tot grote veranderingen in de energiestofwisseling in lever en vetweefsel. Zo wordt tijdens vasten de vetafbraak in het vetweefsel geactiveerd en de glucoseproductie in de lever gestimuleerd. Door muizen waarin een bepaald gen of bepaalde signaal route is geactiveerd of geïnactiveerd bloot te stellen aan vasten kan de rol van dit gen of signaalroute bij de energiehuishouding beter zichtbaar gemaakt worden.
- 4) Koudeblootstelling. Dit experimentele model omvat het blootstellen van muizen aan een lage omgevingstemperatuur (5-7 graden Celsius) gedurende maximaal 10 dagen. Koudeblootstelling leidt tot grote veranderingen in de energiestofwisseling in diverse organen waaronder het vetweefsel. Volgens nieuwe inzichten zou het immuunsysteem hier een belangrijke rol bij spelen. Zo wordt tijdens koude de vetafbraak in het witte vetweefsel geactiveerd en tevens de vetopname in het bruine vetweefsel gestimuleerd. Door muizen waarin een bepaald gen of bepaalde signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd bloot te stellen aan koude kan de rol van dit gen of signaalroute bij het energiemetabolisme beter zichtbaar gemaakt worden.
- 5) Immunactivatie. Dit experimentele model omvat het toedienen van stoffen aan muizen (zoals lipopolysaccharide) die het immuunsysteem activeren. Activatie van het

immuunsysteem leidt tot grote veranderingen in de energiestofwisseling in diverse weefsels. Door muizen waarin een bepaald gen of bepaalde signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd bloot te stellen aan immunactivatie kan de rol van dit gen of signaalroute bij het immuunsysteem en het energiemetabolisme beter zichtbaar gemaakt worden.

- 6) Fysieke inspanning. Dit experimentele model omvat het blootstellen van muizen aan fysieke inspanning op een loopband. Fysieke inspanning leidt tot grote veranderingen in de energiestofwisseling in vooral spier, hart en lever. Tevens ontstaat er een ontstekingsreactie in de spier en mogelijk ook elders. Door muizen waarin een bepaald gen of bepaalde signaal route is geactiveerd of geïnactiveerd bloot te stellen aan fysieke inspanning kan de rol van dit gen of signaalroute bij het energiemetabolisme beter zichtbaar gemaakt worden.

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 onderdelen betreffen verschillende manieren om in verschillende organen en celtypen het energiemetabolisme extra te belasten, waarbij de rol van bepaalde genen of signaalroutes wordt onderzocht. Zo zorgt het geven van een voer dat verrijkt is met vet voor extra belasting van het vetmetabolisme in darm, lever, en vetweefsel, met beperkte effecten op het spierweefsel. Daarentegen zorgt fysieke inspanning voor extra belasting op het energiemetabolisme in spieren. Koudeblootstelling op haar beurt stelt hoge eisen aan het energiemetabolisme in het bruine en witte vetweefsel. Bij alle bovengenoemde belastingen speelt het immuunsysteem tevens een belangrijke rol. Bovenstaande informatie is gebaseerd op diverse eigen experimenten uit het recente verleden, alsmede een veelheid aan data in de literatuur (PMID 22101429, 22700822, 21547079, 21109191, 20858684, 14715917, 24591600). Afhankelijk van de vermoede functie van het gen en/of signaalroutes zullen één of meerdere van de vijf typen experimenten uitgevoerd worden. Aspecten die daarbij worden meegewogen zijn: a) in welke weefsels komt het gen tot expressie en/of is de signaalroute actief; b) wat is de respons van het gen of de signaalroute op koude, vasten, hoogvetvoer, fysieke inspanning; c) in welke mate en in welke weefsels wordt de expressie van het gen of de activiteit van de signaalroute beïnvloed door obesitas, diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten; d) wat is de functie van qua structuur sterk vergelijkbare genen; e) welke overige relevante informatie mbt. de functie van het gen of de signaalroute is beschikbaar vanuit de literatuur.

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

Volgnummer	Type dierproef
1	<i>Genereren en fokken van muizen waarin specifieke genen aan- of uitgeschakeld zijn</i>
2	<i>Hoogvetdieet</i>
3	<i>Vasten</i>
4	<i>Koude</i>
5	<i>Immuunactivatie</i>
6	<i>Fysieke inspanning</i>

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](http://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.	Wageningen University				
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.  <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	<table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Vervaardiging van muizen waarin een bepaald gen of signaalroute geactiveerd of geïnactiveerd is met behulp van adeno-associated virus</td></tr></tbody></table>	Volgnummer	Type dierproef	1	Vervaardiging van muizen waarin een bepaald gen of signaalroute geactiveerd of geïnactiveerd is met behulp van adeno-associated virus
Volgnummer	Type dierproef					
1	Vervaardiging van muizen waarin een bepaald gen of signaalroute geactiveerd of geïnactiveerd is met behulp van adeno-associated virus					

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Om specifieke genen in de muis tot overexpressie te brengen of te inactiveren zal gebruik worden gemaakt van adeno-associated virus (AAV). Met behulp van AAV kan genetisch materiaal worden ingebracht in diverse cellen van de muis. De adeno-associated virussen zullen worden gefabriceerd in samenwerking met een bedrijf. De AAV wordt via intraveneuze injectie bij de muis ingebracht. Het AAV serotype dat gebruikt wordt bepaald in welke weefsel het virus vooral terecht zal komen en waar overexpressie of inactivatie van het specifieke gen zal plaatsvinden. De primaire uitkomstparameter is de expressie van het betreffende gen in dit weefsel. Tenminste de volgende genen zouden we willen activeren of inactiveren: Angptl4, Slc25a47, Hlpda, Vwa8, Angptl8. Van al deze genen is gedeeltelijk bekend of bestaat het vermoeden dat ze betrokken zijn bij het vet- en energiemetabolisme.

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 behandeling bestaat uit eenmalige intraveneuze injectie van een specifiek AAV construct. Het volume van de injectie is 100  $\mu$ L. Er zullen ongeveer  $2.5 \times 10^{11}$  kopieën van het AAV worden geïnjecteerd per muis. Het virus is opgelost in PBS met 5% glycerol. Controle muizen zullen eenmalig worden geïnjecteerd met een controle AAV construct.

De werking van het AAV (dus de overexpressie of inactivatie van een specifiek gen) komt na 1-2 weken tot uiting en blijft gedurende maanden aanhouden.

Het weefsel waar een bepaald gen tot overexpressie moet worden gebracht bepaalt de keuze van het AAV serotype dat zal worden gebruikt. De keuze van het weefsel zal afhangen van: a) in welke weefsels komt het gen tot expressie; b) wat is de respons van het gen in verschillende weefsels op diverse stimuli zoals koude, vasten, hoogvetvoer, en fysieke inspanning; c) in welke mate en in welke weefsels wordt de expressie van het gen beïnvloed door obesitas, diabetes, NAFLD en hart- en vaatziekten; d) welke overige relevante informatie over het gen is beschikbaar vanuit de literatuur.

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

Het benodigde aantal dieren zal worden vastgesteld door middel van een poweranalyse. Mocht er onvoldoende informatie beschikbaar zijn voor een poweranalyse dan zal het aantal dieren worden bepaald op grond van eerdere vergelijkbare experimenten binnen de onderzoeksgroep of op grond van gegevens beschikbaar in de literatuur. Het streven is altijd om het aantal dieren tot een minimum te beperken, zonder concessies te doen aan een gedegen statistische onderbouwing.

## **B. De dieren**

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

De experimenten zullen worden uitgevoerd in mannelijke muizen in de leeftijd van 3-8 maanden. De reden dat voor mannelijke muizen is gekozen is: a) vanwege de in het algemene geringere variatie tussen mannelijke dieren tov. vrouwelijke dieren; b) vanwege consistentie met de literatuur en met door ons zelf in het verleden uitgevoerde experimenten.

De dieren zullen worden gebruikt voor de dierproeven beschreven in bijlagen met volgnummer 2-6. Het benodigde aantal dieren wordt in elk van de onderdelen expliciet vermeld. Daarnaast is voor elk virus/gen een pilot nodig om te onderzoeken of het virus inderdaad de gewenste activatie of inactivatie teweeg brengt. Hiervoor zijn 4 muizen per virus nodig. We willen maximaal 25 verschillende virussen toepassen voor activatie of inactivatie van maximaal 25 verschillende genen. Het geschatte aantal muizen binnen dit type experiment komt uit op maximaal 100.

## **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.

Ja, de meeste dieren zullen worden gebruikt voor de dierproeven beschreven in de bijlagen met volgnummer 2-6. De dieren die worden gebruikt in de pilot om te onderzoeken of het virus inderdaad de gewenste activatie of inactivatie teweeg brengt zullen niet worden hergebruikt.

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

Nee

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

## **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

Vervanging: De injectie van muizen met AAV heeft als doel om specifieke genen tot overexpressie te brengen of te inactiveren, om vervolgens de rol van deze genen bij het energiemetabolisme op te helderen via blootstelling van de muizen aan diverse omstandigheden waarbij het metabolisme op de proef wordt gesteld. Voorbeelden zijn fysieke inspanning, koude, ondervoeding en overvoeding. Activatie of inactivatie van specifieke genen kan ook in-vitro worden uitgevoerd maar het is dan niet mogelijk de invloed vast te stellen van omstandigheden waarbij het energiemetabolisme van de muis op de proef wordt gesteld. Tevens kan in-vitro de rol van een gen bij de metabole interactie tussen diverse organen zoals vetweefsel, de lever en de spieren, niet worden vastgesteld. Om een goed beeld te krijgen van de rol van een bepaald



gen bij het energiemetabolisme tijdens fysieke inspanning is het werken met proefdieren dus noodzakelijk. De aanleiding om de genen verder te onderzoeken zijn overwegend in-vitro studies die een mogelijke rol van het gen in het energiemetabolisme suggereren. Wanneer een vraagstelling beantwoord kan worden via in-vitro experimenten dan zal om ethische redenen altijd voor de in-vitro benadering gekozen worden.

Vermindering: de aantallen muizen in de verschillende studies zullen gebaseerd zijn op poweranalyses, gebruik makend van gegevens uit het verleden of uit de literatuur (indien mogelijk). Er zal voor een zo homogeen mogelijke groep muizen worden gekozen (leeftijd, geslacht, genetische achtergrond) om de variatie tussen de dieren te minimaliseren en daarmee het aantal benodigde dieren te beperken.

Verfijning: er is gekozen voor een methode waarbij volstaat dat de dieren een eenmalige injectie krijgen om langdurig een gen te activeren of inactiveren.

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.

Geen

## 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.

Van tevoren is uitgebreid de biomedische literatuur bestudeerd om uit te zoeken of de beoogde muizen van elders verkregen kunnen worden en/of al soortgelijke experimenten elders zijn uitgevoerd. In dit project bestuderen we de rol van nieuwe genen en signaalroutes die vaak nog niet of minimaal in de literatuur zijn beschreven. De belangrijkste database die wordt geraadpleegd is Pubmed, aangevuld met Google.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

## H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

De intraveneuze injectie van het virus kan een zeer kortstondige pijn geven.

In verband met de korte duur van de injectie wordt geen verdoving of andere pijnverlichtingsmethode toegepast.

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

## I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er is een kleine kans dat de activatie of inactivatie van bepaalde genen en signaalroutes ongerief zal veroorzaken.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De activatie of inactivatie van bepaalde genen zou mogelijk bepaalde pathologische processen kunnen bevorderen, wat gepaard zou kunnen gaan met ongerief.

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

De muizen zullen na toediening van het virus goed in de gaten worden gehouden.

## 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.

Het ongerief bestaat uit een eenmalige kortstondige intraveneuze injectie, wat als licht ongerief wordt geclassificeerd.

## 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

---



## 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](http://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.	Wageningen University	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	2	Hoogvetdieet als stressor voor ophelderen functie van genen

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het voeren van muizen met een voer dat rijk is aan vet is het meest gebruikte diermodel voor obesitas, NAFLD en insuline-ongevoeligheid. Door muizen waarin een bepaald gen of bepaalde signaalroute is geactiveerd/geinactiveerd dit vetrijke voer te geven kan de rol van dit gen of signaalroute bij het energiemetabolisme en bij bovengenoemde ziekten beter zichtbaar gemaakt worden. De primaire uitkomstparameters in de dierproef zijn gewicht van diverse vetdepots, hoeveelheid levervet, concentratie lipiden in plasma, en het aantal immuuncellen in het vetweefsel.

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.

Muizen zullen gedurende maximaal 20 weken een voer krijgen dat extra veel vet bevat (tussen de 45 en 60 energieprocent vet). 60 energieprocent vet wordt gebruikt om muizen zo snel mogelijk dik te maken. 45 energieprocent vet wordt gebruikt indien naast hoogvet ook andere componenten in de voeding (zoals bijvoorbeeld vezel of mineralen) worden gemoduleerd. Als gevolg van het hoogvetvoer ontwikkelen muizen obesitas, NAFLD en insuline-ongevoeligheid. Een controlegroep muizen krijgt voer dat weinig vet bevat (10 energieprocent). De voeders zijn commercieel beschikbaar en worden veelvuldig in de literatuur beschreven. Deze proefopzet is wereldwijd het meest gebruikte diermodel voor obesitas, NAFLD en insuline-ongevoeligheid. De unieke benadering en toegevoegde waarde in dit project is het combineren van het hoogvetvoer met activatie of inactivatie van geselecteerde genen waarvoor aanwijzingen bestaan dat ze een rol spelen bij het vet- en energiemetabolisme. Naast de hoeveelheid vet zal eventueel een andere component in de voeding of het drinkwater (bijvoorbeeld de hoeveelheid en type voedingsvezel,

de hoeveelheid suiker, de concentratie mineralen, een bepaalde metabooliet, of antibiotica) gevarieerd worden om de optimale voersamenstelling te bereiken om de effecten van activatie of inactivatie van geselecteerde genen te onderzoeken.

Tegen het einde van de proef worden bij de dieren testen afgenomen waaronder een glucosetolerantietest en insulinegevoeligheidstest. Hiermee kan de eventuele invloed van activatie of inactivatie van een bepaald gen of signaalroute op insulinegevoeligheid worden vastgesteld.

Bij een glucosetolerantietest worden in de ochtend muizen overgezet naar een schone kooi zonder voer maar met water. Na 5 uur zullen de dieren gewogen worden en vervolgens zal via een kleine incisie in de staart een kleine hoeveelheid bloed (<5uL) worden verzameld om glucose te meten. Meteen daarna zal intraperitoneaal glucose (1 mg/g lichaamsgewicht dmv. een steriele 20% oplossing) worden geïnjecteerd. Op tijdstip 15, 30, 60, 90, 120 en 150 minuten na injectie zal via dezelfde incisie bloed worden verzameld voor glucosemeting. De totale hoeveelheid bloed die op deze manier wordt afgenomen ligt beneden de 50 microliter. Na de meting op 150 minuten gaan de dieren terug in hun kooi met voer en water.

Bij een insulinegevoeligheidstest worden in de ochtend muizen overgezet naar een schone kooi zonder voer maar met water. Na 5 uur zullen de dieren gewogen worden en vervolgens zal via een kleine incisie in de staart een kleine hoeveelheid bloed (<5uL) worden verzameld om glucose te meten. Meteen daarna zal intraperitoneaal insuline (0.75 mU/g lichaamsgewicht) worden geïnjecteerd. Op tijdstip 15, 30, 45, 60 en 90 minuten na injectie zal via dezelfde incisie bloed worden verzameld voor glucosemeting. De totale hoeveelheid bloed die op deze manier wordt afgenomen ligt beneden de 50 microliter. Na de meting op 60 minuten gaan de dieren terug in hun kooi met voer en water.

De glucosetolerantietest en de insulinegevoeligheidstest zullen in dezelfde muizen worden afgenomen met een periode daartussen van minimaal 1 week.

Zowel het voer dat veel vet bevat als het voer dat weinig vet bevat zullen worden gegeven aan muizen waarin een bepaald gen en/of signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd. Tevens zullen de voeders worden gegeven aan een controlegroep van muizen waarin dit gen en/of signaalroute niet is geactiveerd of geïnactiveerd. Een individuele dierproef met hoog en laag vet voer omvat dus minimaal 4 groepen (2 voergroepen X 2 typen muizen). Bovenop het hoogvetdieet kan eventueel ook een andere component in het voer (zoals bijvoorbeeld vezel of suiker, zie boven) gevarieerd worden wat tot uitbreiding van het aantal groepen zal leiden tot maximaal 8

---

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

---

Het benodigde aantal dieren zal worden vastgesteld door middel van een poweranalyse. Mocht er onvoldoende informatie beschikbaar zijn voor een poweranalyse dan zal het aantal dieren worden bepaald op grond van eerdere vergelijkbare experimenten binnen de onderzoeksgroep of op grond van gegevens beschikbaar in de literatuur. Het streven is altijd om het aantal dieren tot een minimum te beperken, zonder concessies te doen aan een gedegen statistische onderbouwing.

---

## **B. De dieren**

---

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

---

De experimenten zullen worden uitgevoerd in mannelijke muizen in de leeftijd van 3-8 maanden. De reden dat voor mannelijke muizen is gekozen is: a) omdat een groot deel van de vrouwelijke muizen vaak wordt ingezet voor de fok van de muizen, zeker in het geval bij de specifieke muizenlijnen met geactiveerde of geïnactiveerde genen; b) vanwege de in het algemene geringere variatie tussen mannelijke dieren tov. vrouwelijke dieren; c) vanwege consistentie met de literatuur en met door ons zelf in het verleden uitgevoerde experimenten.. De specifieke muizenlijnen waarbij bepaalde genen en/of signaalroutes zijn geactiveerd of geïnactiveerd zullen op diverse manieren worden verkregen: 1) aankopen via commerciële dierenlabs, zoals Jackson labs of Harlan, 2) muizenlijn is al beschikbaar in dierfaciliteit, 3) verkregen via samenwerking met een ander lab, 4) zelf vervaardigd (zie bijlage volgnummer 1).

Zoals boven al aangegeven bestaat een individuele dierproef met hoog en laag vet voer uit minimaal 4 en maximaal 8 diergroepen. Uitgaande van maximaal 12 muizen per groep komen we per individuele dierproef op maximaal 96 muizen. Binnen dit project willen we deze

---

experimentele opzet 10 keer toepassen. Het geschatte aantal muizen binnen dit type experiment komt uit op maximaal 960.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

**Vervanging:** er zijn helaas geen goede in-vitro modellen beschikbaar voor obesitas, NAFLD en insuline-ongevoeligheid. Tevens kan de complexiteit van het energiemetabolisme maar in beperkte mate worden nagebootst in-vitro. Vooral de wisselwerking en communicatie tussen de organen bij het energiemetabolisme kan onvoldoende worden onderzocht via experimenten in cellen. Tenslotte is het niet mogelijk de primaire uitkomstparameters van de dierexperimenten (gewicht van diverse vetdepots, hoeveelheid levervet, concentratie lipiden in plasma, en aantal immuuncellen in het vetweefsel) te onderzoeken in in-vitro modelsystemen. De aanleiding om de genen en signaalroutes verder te onderzoeken zijn overwegend in-vitro studies die een mogelijke rol van het gen of de signaalroute in het energiemetabolisme suggereren. Wanneer een vraagstelling beantwoord kan worden via in-vitro experimenten dan zal om ethische redenen altijd voor de in-vitro benadering gekozen worden.

**Vermindering:** de aantallen muizen in de verschillende studies zullen gebaseerd zijn op poweranalyses, gebruik makend van gegevens uit het verleden of uit de literatuur (indien mogelijk). Er zal voor een zo homogeen mogelijke groep muizen worden gekozen (leeftijd, geslacht, genetische achtergrond) om de variatie tussen de dieren te minimaliseren en daarmee het aantal benodigde dieren te beperken. Vermindering van het aantal proefdieren zal verder worden bereikt door de experimenten zo efficiënt mogelijk in te vullen, o.a. door hergebruik van controlegroepen (indien mogelijk).

**Verfijning:** de duur van de vastenperiode voor de insulinegevoeligheidstest en glucosetolerantietest wordt beperkt tot 5 uur, in tegenstelling tot wat in de literatuur gebruikelijk is (16 uur). Op grond van onze ervaringen is 5 uur voldoende om de gewenste metabole effecten te krijgen voor onze metingen. Daarnaast zal olfactorisch en auditief contact tussen de muizen te allen tijde worden mogelijk gemaakt, ook wanneer individuele huisvesting noodzakelijk blijkt, om het ongerief te verminderen.

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 zullen zoveel mogelijk samen gehuisvest worden (3-4 muizen per kooi) om het sociale welzijn van de dieren te optimaliseren, tot het moment waarop de muizen op een specifiek voer worden gezet (zie huisvesting en verzorging). Tevens zal kooiverrijking aanwezig zijn.

De muizen in een proef zullen dagelijks worden geobserveerd om eventuele pijn of lijden tijdig op te merken en de noodzakelijke maatregelen te nemen, inclusief toepassen van humane eindpunten.

## 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.

Van tevoren is uitgebreid de biomedische literatuur bestudeerd om uit te zoeken of de dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. In dit project bestuderen we de rol van nieuwe genen en signaalroutes die vaak nog niet of minimaal in de literatuur zijn beschreven. De belangrijkste database die wordt geraadpleegd is Pubmed, aangevuld met Google.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

De muizen zullen individueel worden gehuisvest vanaf het moment waarop de muizen op een specifiek voer worden gezet vanwege de volgende redenen: a) om de individuele voerinname te kunnen vaststellen; b) om per muis de ontlasting te kunnen verzamelen voor bijvoorbeeld analyse van de hoeveelheid vet; c) omdat het toewijzen van de verschillende muizen aan de verschillende voergroepen via randomisatie verloopt, waardoor de kans groot is dat bestaande nesten ontwricht worden. Het gezamenlijk huisvesten van onbekende mannetjes is ongewenst vanwege het grote risico dat ze gaan vechten.

Om ongerief als gevolg van de individuele huisvesting te verminderen zal auditief en olfactorisch contact mogelijk worden gemaakt. Er zal worden gebruik gemaakt van kooiverrijking in de vorm van tissues en andere attributen.

### 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.

De glucosetolerantietest en de insulinegevoeligheidstest vereisen een eenmalige intraperitoneale injectie, gevolgd door een zestal bloedafnames (<5 uL) via de staart, wat matig ongerief veroorzaakt.

Vanwege de korte duur van de injectie wordt geen verdoving of andere pijnverlichtingsmethode toegepast.

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

Op het eind van de proef zal bloed afgenomen worden via orbitapunctie. Deze handeling zal onder isofluraan verdoving worden uitgevoerd. Om te garanderen dat de muizen volledig onder narcose zijn, zal in de gaten worden gehouden of de muizen reageren op prikkels van buitenaf.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

Het geven van voer dat veel of weinig vet bevat zal geen pijn veroorzaken en zorgt ook niet voor ongerief voor de muizen. Ook het veranderen van andere componenten in de voeding zoals vezel, suiker, mineralen, of een bepaalde metaboliet zal geen ongerief veroorzaken. Er is een hele kleine kans dat de combinatie van hoogvetvoer met activatie of inactivatie van een bepaald gen of signaalroute tot gezondheidsproblemen leidt en er bestaat een nog kleinere kans dat een situatie ontstaat waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen.

In dat laatste geval worden de volgende criteria gehanteerd. Indien de dieren in elkaar gedoken zitten en pilo-erectie vertonen (opzetten haarkleed) en/of als ze niet meer reageren op prikkels zullen de dieren worden geëuthanaseerd. Eveneens in het geval het lichaamsgewicht onverklaarbaar is afgenomen met meer dan 15% binnen twee dagen.

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

De kans dat humane eindpunten zullen moeten worden toegepast is bijzonder klein (<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.

Het ongerief bestaat uit een glucosetolerantietest en insulinegevoeligheidstest (beiden vereisen een korte periode van vasten vòòr de testen worden uitgevoerd, een eenmalige intraperitoneale injectie en een zestal bloedafnames via de staart), en bloedverzameling via de orbita onder verdoving aan het einde van de proef gevolgd door euthenasie via cervicale dislocatie. Verder kan er sprake zijn van ongerief als gevolg van individuele huisvesting. Cumulatief wordt het ongerief geschat op matig.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee



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

Na afloop van de proef worden de dieren opgeofferd om diverse weefsels te verzamelen. De aard van de primaire eindpunten (gewicht van diverse vetdepots, hoeveelheid levervet, concentratie plasma lipiden, aantal immuuncellen in het vetweefsel) vereist dat de dieren worden opgeofferd. De weefsels die verzameld worden zullen worden gebruikt voor talloze aanvullende analyses: histologie, biochemische bepalingen, moleculaire analyses etc. Deze analyses zijn essentieel om de vraagstelling van de proef te kunnen beantwoorden.

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](http://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.	Wageningen University	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	3	Vasten als stressor voor ophelderen functie van genen

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Vasten is een belangrijke evolutionaire prikkel geweest voor zowel mens als dier. Tijdens vasten wordt de energiestofwisseling op de proef gesteld. Zo schakelt het dier over op vetverbranding en wordt de aanmaak van glucose gestimuleerd. Door muizen waarin een bepaald gen of bepaalde signaalroute is geactiveerd/geinactiveerd te vasten kan de rol van dit gen of signaalroute bij het energiemetabolisme vaak veel beter zichtbaar gemaakt worden. De primaire uitkomstparameters in de dierproef zijn gewicht van diverse vetdepots, hoeveelheid levervet, concentratie van lipiden en glucose in plasma.

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.

Tijdens vasten vinden er geleidelijke veranderingen in het energiemetabolisme plaats. Na 5-6 uur vasten is al het voedsel opgenomen en bevindt het lichaam zich in de zogenaamde early post-absorptieve toestand. De lever bevat nog ruim voldoende glycogeen en het plasmagehalte vrije vetzuren is licht verhoogd. Na 16-24 uur vasten (zogenaamde late post-absorptieve toestand) zijn de veranderingen min of meer stabiel waarbij de vetverbranding en de afbraak van het vetweefsel maximaal zijn. De glycogeenvoorraden in de lever zijn vrijwel uitgeput en het plasmagehalte van vrije vetzuren is sterk verhoogd. De maximale duur van vasten wordt daarom vastgelegd op 24 uur (fasted state). Tijdens vasten hebben de dieren wel ad libitum toegang tot drinkwater.

Een metabool tegenovergestelde toestand (fed state: volle glycogeenvoorraden in lever, maximale vetopbouw) wordt bereikt aan het eind van de donkerperiode wanneer de dieren ad libitum toegang hebben tot voer en water. Deze fed state dient als vergelijking/referentie.

Muizen waarin een bepaald gen en/of signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd zullen worden onderworpen aan een periode van 6 of 24 uur vasten of blijven ad libitum toegang hebben tot voer en water. Een controlegroep van muizen waarin dit gen en/of signaalroute niet is geactiveerd of geïnactiveerd zal dezelfde behandelingen ondergaan. Een individuele dierproef met vasten omvat dus minimaal 6 groepen (3 metabole toestanden X 2 typen muizen).

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

Het benodigde aantal dieren zal worden vastgesteld door middel van een poweranalyse. Mocht er onvoldoende informatie beschikbaar zijn voor een poweranalyse dan zal het aantal dieren worden bepaald op grond van eerdere vergelijkbare experimenten binnen de onderzoeksgroep of op grond van gegevens beschikbaar in de literatuur. Het streven is altijd om het aantal dieren tot een minimum te beperken, zonder concessies te doen aan een gedegen statistische onderbouwing.

## **B. De dieren**

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

De experimenten zullen worden uitgevoerd in mannelijke muizen in de leeftijd van 3-8 maanden. De reden dat voor mannelijke muizen is gekozen is: a) omdat een groot deel van de vrouwelijke muizen vaak wordt ingezet voor de fok van de muizen; b) vanwege de in het algemene geringere variatie tussen mannelijke dieren tov. vrouwelijke dieren; c) vanwege consistentie met de literatuur en met door ons zelf in het verleden uitgevoerde experimenten. De specifieke muizenlijnen waarbij bepaalde genen en/of signaalroutes zijn geactiveerd of geïnactiveerd zullen op diverse manieren worden verkregen: 1) aankopen via commerciële dierenlabs, zoals Jackson labs of Harlan, 2) muizenlijn is al beschikbaar in dierfaciliteit, 3) verkregen via samenwerking met een ander lab, 4) zelf vervaardigd (zie bijlage volgnummer 1).

Zoals boven al aangegeven bestaat een individuele dierproef waarbij dieren gevestigd worden uit 6 diergroepen. Uitgaande van maximaal 12 muizen per groep komen we per individuele dierproef op 72 muizen. Binnen dit project willen we deze experimentele opzet 10 keer toepassen. Het geschatte aantal muizen binnen dit type experiment komt uit op maximaal 720.

## **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

Vervanging: de metabole reactie op vasten is een zeer complexe respons waarbij talloze hormonen en andere signaalstoffen betrokken zijn. Om die reden kan de respons op vasten maar in heel beperkte mate worden nagebootst in-vitro. Vooral de wisselwerking en communicatie tussen de organen bij het energiemetabolisme kan onvoldoende worden onderzocht via experimenten in cellen. Tenslotte is het niet mogelijk de primaire uitkomstparameters van de dierexperimenten (gewicht van diverse vetdepots, hoeveelheid levervet, en concentratie lipiden en glucose in plasma) te onderzoeken in in-vitro modelsystemen. De aanleiding om de genen en signaalroutes verder te onderzoeken zijn overwegend in-vitro studies die een mogelijke rol van het gen of de signaalroute in het energiemetabolisme suggereren. Wanneer een vraagstelling

beantwoord kan worden via in-vitro experimenten dan zal om ethische redenen altijd voor de in-vitro benadering gekozen worden.

Vermindering: de aantallen muizen in de verschillende studies zullen gebaseerd zijn op poweranalyses, gebruik makend van gegevens uit het verleden of uit de literatuur (indien mogelijk). Er zal voor een zo homogeen mogelijke groep muizen worden gekozen (leeftijd, geslacht, genetische achtergrond) om de variatie tussen de dieren te minimaliseren en daarmee het aantal benodigde dieren te beperken. Vermindering van het aantal proefdieren zal verder worden bereikt door de experimenten zo efficiënt mogelijk in te vullen, o.a. door hergebruik van controlegroepen (indien mogelijk).

Verfijning: de duur van de vastenperiode wordt beperkt tot maximaal 24 uur. In de literatuur wordt regelmatig een vastenperiode van 48 uur of zelfs 72 uur beschreven. De toegevoegde waarde van één of twee extra dagen vasten is beperkt.

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 zullen samen gehuisvest worden (3-4 muizen per kooi) om het sociale welzijn van de dieren te optimaliseren. Tevens is kooiverrijking aanwezig. De muizen in een vastenproef zullen om de 4-5 uur, inclusief 's nachts, worden geobserveerd om eventuele pijn of lijden tijdig op te merken en de noodzakelijke maatregelen te nemen, inclusief toepassen van humane eindpunten.

## 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.

Van tevoren is uitgebreid de biomedische literatuur bestudeerd om uit te zoeken of de dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. In dit project bestuderen we de rol van nieuwe genen en signaalroutes die vaak nog niet of minimaal in de literatuur zijn beschreven. De belangrijkste database die wordt geraadpleegd is Pubmed, aangevuld met Google.

## 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.

Op het eind van de proef zal bloed afgenomen worden via orbitapunctie. Deze handeling zal onder isofluraan verdoving worden uitgevoerd. Om te garanderen dat de muizen volledig onder narcose zijn, zal in de gaten worden gehouden of de muizen reageren op prikkels van buitenaf.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Hoewel vasten geen pijn veroorzaakt bij muizen kan het wel voor ongerief zorgen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het onthouden van voer zorgt voor honger bij de muizen en daarmee ongerief.

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

Om het ongerief zo veel mogelijk te beperken zal de vastenperiode worden beperkt tot maximaal 24 uur.

### 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.

Er is een hele kleine kans dat de combinatie van vasten met activatie of inactivatie van een bepaald gen of signaalroute tot gezondheidsproblemen leidt en er bestaat een nog kleinere kans dat een situatie ontstaat waarbij het toepassen van humane eindpunten geïndiceerd is om verder lijden van de dieren te voorkomen.

In dat laatste geval worden de volgende criteria gehanteerd. Indien de dieren in elkaar gedoken zitten en pilo-erectie vertonen (opzetten haarkleed) en/of als ze niet meer reageren op prikkels zullen de dieren worden geëuthanaseerd.

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

De kans dat humane eindpunten zullen moeten worden toegepast is bijzonder klein (<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.

Het ongerief bestaat uit vasten variërend in duur van 6 of 24 uur. De mate van ongerief wordt ingeschat op gering tot matig, afhankelijk van de duur van vasten. Bloed zal onder verdoving verzameld worden via orbitapunctie gevolgd door euthenasie via cervicale dislocatie. Cumulatief wordt het ongerief ingeschat op matig.

## Einde experiment

## L. Wijze van doden

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

Nee

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

Na afloop van de proef worden de dieren opgeofferd om diverse weefsels te verzamelen. De aard van de primaire eindpunten (gewicht van diverse vetdepots, hoeveelheid levervet, concentratie lipiden en glucose in plasma) vereist dat de dieren worden opgeofferd. De weefsels die verzameld worden zullen worden gebruikt voor talloze aanvullende analyses: histologie, biochemische bepalingen, moleculaire analyses etc. Deze analyses zijn essentieel om de vraagstelling van de proef te kunnen beantwoorden.

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](http://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.	Wageningen University	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	4	Koudeblootstelling als stressor voor ophelderen functie van genen

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het blootstellen van muizen aan een koude omgevingstemperatuur is een veelgebruikt model om activatie van het zogenaamde bruine vet te bewerkstelligen. Bruin vet is een orgaan met de capaciteit om energie (en dus calorïën) om te zetten in warmte. Dit wordt ook wel thermogenese genoemd. De activatie van bruin vet door koudeblootstelling zorgt, naast veranderingen in het bruin vet zelf, voor grote veranderingen in het energiemetabolisme van andere organen. Zo wordt tijdens koude de vetafbraak in het witte vetweefsel sterk geactiveerd. Door muizen waarin een bepaald gen of bepaalde signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd bloot te stellen aan koude kan de rol van dit gen of signaalroute in het energiemetabolisme beter zichtbaar gemaakt worden. De primaire uitkomstparameters zijn lichaamstemperatuur, het gewicht van diverse vetdepots, concentratie van lipiden in plasma, histologie van het bruin vet en de expressie van verschillende genen in bruin en wit vet.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

De muizen zullen gedurende minimaal 8 uur en maximaal 10 dagen blootgesteld worden aan een koude omgevingstemperatuur (5-7 graden Celsius). Bij een korte periode van koudeblootstelling behoudt het dier zijn lichaamswarmte voornamelijk door spieractiviteit maar tegelijkertijd worden al diverse processen in het bruine vet in gang gezet. Het dier maakt vooral gebruik van bestaande vetvoorraden als energiebron. Bij langdurige koudeblootstelling behoudt het dier zijn lichaamswarmte voornamelijk via thermogenese en is het bruine vet maximaal geactiveerd. De vetvoorraden zijn grotendeels uitgeput en het dier verkrijgt extra energie door een sterk verhoogde voerinnname. Er is gekozen voor een koude omgevingstemperatuur van 5-7 graden

Celsius omdat bekend is dat muizen een temperatuurverandering van 15 graden Celsius kunnen verdragen. Bij een grotere temperatuursverandering ontstaat het risico dat muizen niet meer in staat zijn hun lichaamstemperatuur te handhaven. Met een normale omgevingstemperatuur van ongeveer 20-22 graden Celsius komen we daarom uit op 5-7 graden Celsius. Een controlegroep muizen zal worden blootgesteld aan een omgevingstemperatuur waar bruin vet in het geheel niet geactiveerd wordt (thermoneutrale temperatuur, 28-30 graden Celsius). Door muizen met sterke bruinvetactivatie te vergelijken met muizen met geen bruinvetactivatie, kan het effect van een bepaald gen of bepaalde signaalroute op het energiemetabolisme na kortstondige of langdurige bruinvetactivatie optimaal geanalyseerd worden. Deze opzet is veelgebruikt in literatuur en meerdere malen met succes toegepast in onze onderzoeksgroep.

Voor aanvang van de proef zal subcutaan in de flank een speciale chip worden geplaatst waarmee vervolgens met een uitleesapparaat op afstand de lichaamstemperatuur non-invasief kan worden vastgesteld.

Ten tijde van een langdurige koudeblootstelling kan maximaal éénmaal per 24 uur, en niet vaker dan driemaal per 5 dagen, een kleine hoeveelheid bloed worden afgenomen via staartbloeding (<25 uL). Dit wordt gedaan om de reactie van de muizen op koudeblootstelling zo goed mogelijk in kaart te brengen door verschillende plasmaparameters te analyseren, en daardoor de rol van een bepaald gen en/of signaalroute optimaal te onderzoeken.

Koudeblootstelling en het plaatsen van muizen op thermoneutrale temperatuur zal worden uitgevoerd met muizen waarin een bepaald gen en/of signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd, alsmede in een controlegroep muizen waarin dat bepaalde gen en/of signaalroute NIET is geactiveerd of geïnactiveerd. Een individuele dierproef bestaat dus uit 8 groepen (2 tijdstippen X 2 omgevingstemperaturen X 2 typen muizen).

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

Het benodigde aantal dieren zal worden vastgesteld door middel van een poweranalyse. Mocht er onvoldoende informatie beschikbaar zijn voor een poweranalyse dan zal het aantal dieren worden bepaald op grond van eerdere vergelijkbare experimenten binnen de onderzoeksgroep of op grond van gegevens beschikbaar in de literatuur. Het streven is altijd om het aantal dieren tot een minimum te beperken, zonder concessies te doen aan een gedegen statistische onderbouwing.

### **B. De dieren**

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

De experimenten zullen worden uitgevoerd in mannelijke muizen in de leeftijd van 3-8 maanden. De reden dat voor mannelijke muizen is gekozen is: a) omdat een groot deel van de vrouwelijke muizen vaak wordt ingezet voor de fok van de muizen; b) vanwege de in het algemene geringere variatie tussen mannelijke dieren tov. vrouwelijke dieren; c) vanwege consistentie met de literatuur en met door ons zelf in het verleden uitgevoerde experimenten. De specifieke muizenlijnen waarbij bepaalde genen en/of signaalroutes zijn geactiveerd of geïnactiveerd zullen op diverse manieren worden verkregen: 1) aankopen via commerciële dierenlabs, zoals Jackson labs of Harlan, 2) muizenlijn is al beschikbaar in dierfaciliteit, 3) verkregen via samenwerking met een ander lab, 4) zelf vervaardigd (zie bijlage volgnummer 6).

Zoals hierboven aangegeven bestaat een individuele dierproef met koudeblootstelling uit 8 groepen. Uitgaande van maximaal 12 muizen per groep komen we per individuele dierproef op maximaal 96 muizen. Binnen dit project willen we deze experimentele opzet 8 keer toepassen. Het geschatte aantal muizen binnen dit type experiment komt uit op maximaal 768.

### **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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



geacht.

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

Nee

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

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

**Vervanging:** De metabole veranderingen die optreden in o.a. bruin vetweefsel ten tijde van koudeblootstelling zijn een resultaat van de interactie tussen meerdere organen, waaronder de hersenen, bruin en wit vetweefsel. Deze interactie tussen verschillende organen kan helaas nog niet in-vitro worden nagebootst. Om een goed beeld te krijgen van de rol van een bepaald gen en/of signaalroute in het energiemetabolisme ten tijde van koudeblootstelling is het werken met proefdieren dus noodzakelijk. De aanleiding om de genen en signaalroutes verder te onderzoeken zijn overwegend in-vitro studies die een mogelijke rol van het gen of de signaalroute in het energiemetabolisme suggereren. Wanneer een vraagstelling beantwoord kan worden via in-vitro experimenten dan zal om ethische redenen altijd voor de in-vitro benadering gekozen worden.

**Vermindering:** de aantallen muizen in de verschillende studies zullen gebaseerd zijn op poweranalyses, gebruik makend van gegevens uit het verleden of uit de literatuur (indien mogelijk). Er zal voor een zo homogeen mogelijke groep muizen worden gekozen (leeftijd, geslacht, genetische achtergrond) om de variatie tussen de dieren te minimaliseren en daarmee het aantal benodigde dieren te beperken. Vermindering van het aantal proefdieren zal verder worden bereikt door de experimenten zo efficiënt mogelijk in te vullen, o.a. door hergebruik van controlegroepen op thermoneutrale temperatuur (indien mogelijk).

**Verfijning:** De lichaamstemperatuur van de muizen wordt gemeten door middel van een vooraf geïmplanteerde chip. Dit voorkomt dat de lichaamstemperatuur van de muizen gemeten moet worden via het rectum, hetgeen veel stress voor de muizen met zich meebrengt. Het inbrengen van de chips voor het aflezen van de lichaamstemperatuur wordt gedaan onder een licht isofluraanroesje om het ongerief (voornamelijk stress) van de muizen te verminderen.

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

Voor de koudeblootstellingsproeven moeten de muizen individueel gehuisvest worden. Dit is essentieel omdat muizen in een koudere omgeving de neiging hebben om elkaar warm te gaan houden wat het effect van de proef zou kunnen beïnvloeden. Om ongerief zo veel mogelijk te verminderen zal olfactorisch en auditief contact tussen de dieren worden mogelijk gemaakt. Ook zal kooiverrijking aanwezig zijn, zodat ook de muizen die aan koude worden blootgesteld aan normale nestvorming kunnen doen.

Het is mogelijk dat bepaalde muizengroepen een slechtere adaptatie tot de kou hebben, wat uiteindelijk kan leiden tot een sterke daling in hun lichaamstemperatuur. Overigens is op basis van literatuur de kans zeer klein dat muizen niet met koudeblootstelling om kunnen gaan. Om mogelijk ongerief op te merken zal de lichaamstemperatuur van de muizen worden gemeten door middel van een vooraf geïmplanteerde thermosensorchip. Op deze manier kunnen de muizen goed gevolgd worden en direct uit de proef gehaald worden wanneer zij een slechte adaptatie vertonen.

## **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.

Van tevoren is uitgebreid de biomedische literatuur bestudeerd om uit te zoeken of de dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. In dit project bestuderen we de rol van nieuwe genen en signaalroutes die vaak nog niet of minimaal in de literatuur zijn beschreven. De belangrijkste database die wordt geraadpleegd is Pubmed, aangevuld met Google.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

De muizen zullen individueel worden gehuisvest vanaf het moment waarop de muizen aan koude of warmte zullen worden blootgesteld vanwege de volgende redenen: a) om de individuele voerinnamen te kunnen vaststellen; b) omdat het toewijzen van de verschillende muizen aan de verschillende voergroepen via randomisatie verloopt, waardoor de kans groot is dat bestaande nesten ontwricht worden; c) omdat muizen wanneer gehuisvest in groepen de neiging hebben om elkaar warm te gaan houden, wat het effect van een koudeblootstelling zou kunnen beïnvloeden.

Om ongerief als gevolg van de individuele huisvesting te verminderen zal auditief en olfactorisch contact mogelijk worden gemaakt. Er zal worden gebruik gemaakt van kooiverrijking in de vorm van tissues en andere attributen.

### 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.

De bloedafnames kunnen enige pijn veroorzaken, maar vanwege de korte duur van de bloedafnames wordt geen verdoving of andere pijnverlichtingsmethode toegepast.

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

Het implanteren van een thermosensorchip geschiedt onder verdoving waarmee pijn wordt voorkomen.

Op het eind van de proef zal bloed afgenomen worden via orbitapunctie. Deze handeling zal onder isofluraan verdoving worden uitgevoerd. Om te garanderen dat de muizen volledig onder narcose zijn, zal in de gaten worden gehouden of de muizen reageren op prikkels van buitenaf.

### **I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen**

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Voor de koudeblootstellingsproeven moeten de muizen individueel gehuisvest worden, wat tegen de natuur van muizen, zijnde sociale dieren, ingaat. Daarnaast kan koudeblootstelling gedurende de eerste dag als onprettig worden ervaren door de muizen. Zij zullen bijvoorbeeld door de lagere omgevingstemperatuur de eerste dag minder actief zijn en proberen zichzelf warm te houden door in de bedding te kruipen. Door de interne adaptaties die optreden zijn de muizen snel gewend aan de koude en vertonen daarbij normaal gedrag, behalve dat ze meer gaan eten.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Individuele huisvesting is essentieel omdat muizen in een koudere lichaamsomgeving de neiging hebben om elkaar warm te gaan houden wat het effect van de proef zou kunnen beïnvloeden. Om geen systematisch verschil in sociale omgeving te introduceren tussen de muizen die wel en niet aan koude worden blootgesteld moeten ook de muizen die bij 28 graden geplaatst zullen worden individueel worden gehuisvest.

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

Om ongerief zo veel mogelijk te verminderen zal olfactorisch en auditief contact tussen de dieren worden mogelijk gemaakt. Om het ongerief van zowel de individuele huisvesting en de koudeblootstelling te verlagen zal een ruime hoeveelheid kooiverrijking aanwezig zijn, zodat alle muizen aan normale nestvorming kunnen doen.

### **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.

Er is een hele kleine kans dat de combinatie van koudeblootstelling met activatie of inactivatie van een bepaald gen of signaalroute tot een sterke afname in lichaamstemperatuur leidt. Hoewel in de literatuur maar zeer weinig muismodellen bekend zijn waar een dergelijke daling in lichaamstemperatuur gezien wordt, kan deze mogelijkheid niet uitgesloten worden. Om deze reden worden de muizengroepen die aan koude worden blootgesteld geïnjecteerd met thermosensorchips om de lichaamstemperatuur goed te kunnen monitoren. Om er voor te zorgen dat de muizen geen onnodig ongerief ondervinden wanneer zij zich slecht aanpassen aan een lage omgevingstemperatuur, zullen muizen worden gedood wanneer hun lichaamstemperatuur onder de 19 graden Celsius komt. Uit onderzoek is gebleken dat 16-19 graden Celsius het "point of no return" is waarbij de muis niet meer erin slaagt de lichaamstemperatuur vast te houden. We hebben voor de bovengrens gekozen omdat bij het bereiken van die temperatuur al duidelijk is dat de thermoregulatie ernstig verstoord is en we extra ongerief willen vermijden. Op het moment dat het vermoeden bestaat dat bepaalde muizen zich slecht aanpassen (lage lichaamstemperatuur, onbeweeglijk zitten in de kooi en niet responsief op een externe stimulus) zal hun lichaamstemperatuur zeer regelmatig worden afgelezen en zal hun welzijn extra in de gaten worden gehouden. Wanneer een lage lichaamstemperatuur gecombineerd wordt met in elkaar gedoken zitten en/of pilo-erectie vertonen (opzetten haarkleed) en/of het niet meer reageren op prikkels, zullen de dieren worden geëuthanaseerd. Dit zal ook het geval zijn wanneer het lichaamsgewicht van de dieren met meer dan 15% afneemt binnen twee dagen.

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

De kans dat humane eindpunten zullen moeten worden toegepast is bijzonder klein (<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.

Het ongerief voor muizen blootgesteld aan thermoneutrale temperatuur is gesteld op licht. Deze muizen kunnen negatieve effecten ondervinden van mogelijke tussentijdse bloedafname, de individuele huisvesting, en orbitapunctie onder anesthesie gevolgd door euthenasie via cervicale dislocatie. Bij deze muizen zal geen thermosensorchip worden ingebracht.

Het ongerief voor de muizen blootgesteld aan koude is matig. Deze muizen kunnen negatieve effecten ondervinden van mogelijke tussentijdse bloedafname, inbrengen van de thermosensorchip, individuele huisvesting, de lage omgevingstemperatuur, en orbitapunctie onder anesthesie gevolgd door euthenasie via cervicale dislocatie.

### 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.

Na afloop van de proef worden de dieren opgeofferd om diverse weefsels te verzamelen. De aard van de primaire eindpunten (het gewicht van diverse vetdepots, concentratie van plasma lipiden, histologie van het bruin vet en de expressie van verschillende genen in bruin en wit vet) vereist dat de dieren worden opgeofferd. De weefsels die verzameld worden zullen worden gebruikt voor talloze aanvullende analyses: histologie, biochemische bepalingen, moleculaire analyses etc. Deze analyses zijn essentieel om de vraagstelling van de proef te kunnen beantwoorden.

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](http://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.	Wageningen University	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	5	Activatie van het immuunsysteem als stressor voor ophelderen functie van genen en pathways

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Naast een sterke toename van vetmassa ontwikkelen mensen met overgewicht een chronische milde ontsteking. In het bloed van individuen met overgewicht is de concentratie van tal van ontstekingsparameters verhoogd. Deze ontstekingsparameters spelen waarschijnlijk een rol bij de ontwikkeling van hart- en vaatziekten en type 2 diabetes. Enerzijds leidt activatie van het immuunsysteem tot grote veranderingen in de energiestofwisseling van verschillende weefsels. Anderzijds kunnen veranderingen in energiestofwisseling op hun beurt weer leiden tot activatie van het immuunsysteem. Deze interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme willen we beter in kaart brengen, waarbij in het bijzonder de aandacht uitgaat naar de interacties tussen immuuncellen en cellen die een belangrijke rol spelen in het energiemetabolisme (zoals vetweefsel- of levercellen). Door een belangrijke functie van immuuncellen te remmen of immuuncellen juist te activeren in obese muizen – wat bereikt wordt door de muizen een hoogvetvoer te geven zoals beschreven in experiment/onderdeel 1 – kan inzicht vergaard worden in de rol van het immuunsysteem bij de ontwikkeling van aan obesitas gekoppelde complicaties. In dit type experiment kan de rol van bepaalde genen of signaalroutes in de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme achterhaald worden door muizen waarin dit bepaalde gen of deze bepaalde signaalroute is geïnactiveerd of geactiveerd, bloot te stellen aan stoffen die het immuunsysteem beïnvloeden. De primaire uitkomstparameters zullen verschillende ontstekingsfactoren en immuuncellen in het bloed en metabole organen zoals de lever en het vetweefsel zijn, alsmede metabole parameters in het bloed.

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.

Om inzicht te vergaren in de interacties tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme zullen cellen van het immuunsysteem op verschillende manieren worden gemanipuleerd. Dit kan door (een functie van) het immuunsysteem te activeren of juist te inactiveren. Voorbeelden hiervan zijn een activatie van het immuunsysteem middels een component van het celmembraan van gram-negatieve bacteriën: lipopolysaccharide (LPS), of een inactivatie van een belangrijke functie van immuuncellen, zoals fagocytose, door middel van BMS-777607. Dergelijke stoffen zullen oraal worden toegediend (via het voer, drinkwater, of orale gavage), of zullen intraveneus of intraperitoneaal ingespoten worden. Afhankelijk van de aard en werking van de stof zullen de dieren eenmalig of meerdere dagen aan de stof blootgesteld worden en zal de stof hierbij dagelijks of met tussenposen gegeven worden. Ter vergelijking zal naast elke behandeling ook een controle behandeling gegeven worden bestaande uit enkel de matrix waarin bovengenoemde stoffen worden toegediend.

Naast het manipuleren van de activiteit van het immuunsysteem, is het van belang het gedrag en functioneren van immuuncellen in kaart te brengen om de interacties tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme verder te doorgronden. Speciale aandacht gaat hierin uit naar het vetweefsel, waar interactie tussen bepaalde immuuncellen (macrofagen) en vetcellen vergaande gevolgen lijkt te hebben voor de ontwikkeling van ontsteking in het vetweefsel en hiermee een belangrijke rol heeft in de ontwikkeling van systemische ontsteking bij obesitas. Het vetweefsel bevat veel verschillende soorten cellen. Om het gedrag van een specifiek type immuuncel, de macrofaag, goed te kunnen onderzoeken zullen gelabelde cellen eenmalig intraperitoneaal of intraveneus geïnjecteerd worden. Op deze manier kunnen deze cellen gemakkelijk terug gevonden worden in de totale populatie cellen in het vetweefsel en zodoende kan het fenotype van deze cel na interacties met vetcellen en andere (immuun)cellen in het vetweefsel in kaart gebracht worden. De gelabelde cellen zullen door middel van celkweek worden gegenereerd en zijn oorspronkelijk op diverse manieren verkregen, waaronder aankoop, donatie door collegaonderzoekers, of het zelf verzamelen uit de botten van kadavers. Hierbij is in geen van de gevallen sprake van ongerief.

Omdat de interactie tussen het immuunsysteem en cellen die een belangrijke rol spelen in de energiestofwisseling van organen juist tijdens de ontwikkeling van obesitas een belangrijke rol lijkt te spelen, zullen bovenbeschreven behandelmethoden mogelijk samen gaan met een dieetinterventie waarin muizen maximaal 20 weken een voer krijgen dat extra veel vet bevat (tussen de 45 en 60 energieprocent vet). De muizen ontwikkelen daardoor obesitas, NAFLD en insuline ongevoeligheid. Daarbij wordt een controlegroep van muizen meegenomen die voer krijgt wat weinig vet bevat (10 energieprocent).

De stoffen die het immuunsysteem moduleren zullen gegeven worden aan muizen op een laagvetdieet en/of hoogvetdieet waarbij mogelijk tevens een bepaald gen en/of signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd. Daarbij wordt een controle groep van wildtype muizen meegenomen. Een individuele dierproef met een groep die wel of geen immunomodulerende stof ontvangt omvat aldus maximaal 8 groepen (2 behandelgroepen X 2 typen muizen X 2 typen voer). Waar mogelijk zal worden gecombineerd met experimenten zoals beschreven in onderdeel 1 om de aantallen proefdieren zoveel mogelijk te beperken.

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

Het benodigde aantal dieren zal worden vastgesteld door middel van een poweranalyse. Mocht er onvoldoende informatie beschikbaar zijn voor een poweranalyse dan zal het aantal dieren worden bepaald op grond van eerdere vergelijkbare experimenten binnen de onderzoeksgroep of op grond van gegevens beschikbaar in de literatuur. Het streven is altijd om het aantal dieren tot een minimum te beperken, zonder concessies te doen aan een gedegen statistische onderbouwing.

## **B. De dieren**

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

De experimenten zullen worden uitgevoerd in mannelijke muizen in de leeftijd van 3-8 maanden. De reden dat voor mannelijke muizen is gekozen is: a) omdat een groot deel van de vrouwelijke muizen vaak wordt ingezet voor de fok van de muizen; b) vanwege de in het algemene geringere variatie tussen mannelijke dieren tov. vrouwelijke dieren; c) vanwege consistentie met de literatuur en met door ons zelf in het verleden uitgevoerde experimenten. De specifieke muizenlijnen waarbij bepaalde genen en/of signaalroutes zijn geactiveerd of geïnactiveerd zullen op diverse manieren worden verkregen: 1) aankopen via commerciële dierenlabs, zoals Jackson labs of Harlan, 2) muizenlijn is al beschikbaar in dierfaciliteit, 3) verkregen via samenwerking met een ander lab, 4) zelf vervaardigd (zie bijlage volgnummer 1).

Zoals boven al aangegeven is bestaat een individuele dierproef waarin immunomodulerende stoffen toegediend worden uit maximaal 8 groepen. Uitgaande van maximaal 12 muizen per groep komen we per individuele dierproef op maximaal 96 muizen. Binnen dit project willen we deze experimentele opzet 8 keer toepassen. Het geschatte aantal muizen binnen dit type experiment komt uit op maximaal 768.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

**Vervanging:** De interacties tussen immuuncellen en de energiestofwisseling in verschillende metabool actieve organen zoals het vetweefsel en de lever zijn niet in-vitro te onderzoeken. Meerdere organen en verschillende (combinaties van) immuuncellen spelen een rol in deze wisselwerking, wat het vrijwel onmogelijk maakt om dit in-vitro na te bootsen. Ook lenen de primaire uitkomstparameters van de dierexperimenten (concentratie ontstekingsfactoren en aantallen immuuncellen in het bloed en in metabole organen zoals de lever en het vetweefsel) zich minder goed voor onderzoek met behulp van in-vitro modelsystemen. De aanleiding om de genen en signaalroutes verder te onderzoeken zijn overwegend in-vitro studies die een vermoedelijke rol van het gen of de signaalroute bij immuuncelfunctie of energiemetabolisme hebben blootgelegd. Wanneer een vraagstelling beantwoord kan worden via in-vitro experimenten dan zal om ethische redenen altijd voor de in-vitro benadering gekozen worden.

**Vermindering:** de aantallen muizen in de verschillende studies zullen gebaseerd zijn op poweranalyses, gebruik makend van gegevens uit het verleden of uit de literatuur (indien mogelijk). Er zal voor een zo homogeen mogelijke groep muizen worden gekozen (leeftijd, geslacht, genetische achtergrond) om de variatie tussen de dieren te minimaliseren en daarmee het aantal benodigde dieren te beperken. Vermindering van het aantal proefdieren zal verder worden bereikt door de experimenten zo efficiënt mogelijk in te vullen, o.a. door hergebruik van controlegroepen (indien mogelijk), bijvoorbeeld door te combineren met experimenten zoals beschreven in onderdeel 1 (hoogvetvoer).

**Verfijning:** De duur en frequentie alsmede de wijze van toediening van immunomodulerende stoffen of cellen zullen zo bepaald worden dat het beoogde resultaat behaald wordt met zo gering mogelijk ongerief. Uit ethisch oogpunt, maar ook omdat ongerief in de dieren de interacties tussen het immuunsysteem en

energiestofwisseling kan verstoren, zal het ongerief te allen tijde zo gering mogelijk gehouden worden. De stoffen die worden toegediend zullen hooguit een milde ontsteking veroorzaken.

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 zullen zoveel mogelijk samen gehuisvest worden (3-4 muizen per kooi) om het sociale welzijn van de dieren te optimaliseren. Tevens is kooiverrijking aanwezig. Alleen wanneer de huisvesting met meerdere muizen in een kooi botst met de doelstellingen van de proef zal op individuele huisvesting worden overgegaan.

De muizen in een proef zullen dagelijks worden geobserveerd om eventuele pijn of lijden tijdig op te merken en de noodzakelijke maatregelen te nemen, inclusief toepassen van humane eindpunten.

## 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.

Van tevoren is uitgebreid de biomedische literatuur bestudeerd om uit te zoeken of de dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. In dit project bestuderen we de rol van nieuwe genen en signaalroutes die vaak nog niet of minimaal in de literatuur zijn beschreven. De belangrijkste database die wordt geraadpleegd is Pubmed, aangevuld met Google.

## 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.

Er kan worden gekozen voor individuele huisvesting: a) om de individuele voeriname te kunnen vaststellen omdat de behandeling daarop invloed zou kunnen hebben; b) omdat het toewijzen van de verschillende muizen aan de verschillende behandeling en voergroepen via randomisatie verloopt, waardoor de kans groot is dat bestaande nesten ontwricht worden.

Om ongerief als gevolg van de individuele huisvesting te verminderen zal auditief en olfactorisch contact mogelijk worden gemaakt. Er zal worden gebruik gemaakt van kooiverrijking in de vorm van tissues en andere attributen.

### 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.

Het toedienen van stoffen die op het immuunsysteem inwerken of een injectie van gelabelde cellen zal lichte pijn kunnen veroorzaken door de toediening zelf (via orale gavage, intraveneuze of intraperitoneale injectie) en een mogelijk milde ontsteking door de werking van de stoffen. Deze ontsteking zal maximaal 24 uur duren.

In verband met de korte duur van de injectie en orale gavage wordt geen verdoving of andere pijnverlichtingsmethode toegepast. De milde ontsteking die kan worden geïnduceerd na toediening van de stoffen (en in veel gevallen niet zal ontstaan) zal van korte duur zijn en matig ongerief veroorzaken. Er worden in deze gevallen dan ook geen pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden toegepast.

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

Op het eind van de proef zal bloed afgenomen worden via orbitapunctie. Deze handeling zal onder isofluraan verdoving worden uitgevoerd. Om te garanderen dat de muizen volledig onder narcose zijn, zal in de gaten worden gehouden of de muizen reageren op prikkels van buitenaf.

#### **I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen**

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Geen

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

#### **J. Humane eindpunten**

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

In alle gevallen zal de minimale behandelingsduur en frequentie worden aangehouden waarbij op basis van literatuur of eigen bevinding de beoogde modulatie van het immuunsysteem behaald wordt. Hierdoor is er een erg kleine kans dat er omstandigheden ontstaan waarbij ernstig lijden en humane eindpunten toegepast dienen te worden om verder lijden te voorkomen.

Mocht er zich wel een dergelijke situatie voordoen, dan worden de volgende criteria gehanteerd. Indien de dieren in elkaar gedoken zitten en pilo-erectie vertonen (opzetten haarkleed) en/of als ze niet meer reageren op prikkels zullen de dieren worden geëuthanaseerd. Eveneens in het geval het lichaamsgewicht met meer dan 15% is afgenomen in twee dagen tijd.

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

Aangezien altijd de minimale behandelingsduur en frequentie zal worden aangehouden waarbij op basis van literatuur of eigen bevinding de beoogde modulatie van het immuunsysteem behaald wordt, is de kans dat humane eindpunten zullen moeten worden toegepast relatief klein. Deze kans wordt ingeschat op <5%.

### K. Classificatie van ongerief

Geef aan hoe in het licht van alle hierboven beschreven negatieve effecten het cumulatief ongerief wordt geclassificeerd in termen van 'terminaal', 'licht', 'matig' of 'ernstig' ongerief.

Het ongerief bestaat uit toediening van bepaalde immuunactiverende of –remmende stoffen of cellen middels orale toediening, intra peritoneale of intraveneuze injectie. Zowel de toedieningsmethoden als de milde ontsteking die mogelijk ontstaat door de werking van de stoffen wordt als matig ongerief ingeschat. Bloed zal onder verdoving verzameld worden via de orbitapunctie waarna de muizen worden geëuthanaseerd door cervicale dislocatie. Cumulatief wordt het ongerief ingeschat op matig.

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Na afloop van de proef worden de dieren opgeofferd om diverse weefsels te verzamelen. De aard van de primaire uitkomstparameters (ontstekingsfactoren en immuuncellen in het bloed en metabole organen) vereist dat de dieren worden opgeofferd. De weefsels die verzameld worden zullen tevens worden gebruikt voor talloze aanvullende analyses: histologie, biochemische bepalingen, moleculaire analyses etc. Deze analyses zijn essentieel om de vraagstelling van de proef te kunnen beantwoorden.

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](http://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.	Wageningen University	
1.3	Vul het volgnummer en het type dierproef in.	Volgnummer	Type dierproef
	<i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i>	6	Fysieke inspanning als stressor voor ophelderen functie genen

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

Het blootstellen van muizen aan fysieke inspanning is een veelgebruikt model om het energiemetabolisme in de spier en andere weefsels te stimuleren. Tijdens fysieke inspanning wordt lichaamsvet afgebroken om als energiebron te fungeren. Het vet wordt opgenomen in de spieren om daar via oxidatieve processen te worden afgebroken tot kooldioxide en water. Hierbij komt veel energie vrij die door de spieren gebruikt wordt om samen te trekken en werk te verrichten. Door muizen waarin een bepaald gen of bepaalde signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd bloot te stellen aan fysieke inspanning kan de rol van dit gen of signaalroute in het energiemetabolisme beter zichtbaar gemaakt worden. De primaire uitkomstparameters zijn maximaal loopvermogen, concentratie van lipiden en glucose in plasma, en de expressie van verschillende genen in spierweefsel.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

De muizen zullen eerst vertrouwd worden gemaakt met de loopband door hen een drietal opeenvolgende dagen gedurende 15 minuten op de loopband te plaatsten met een loopsnelheid van 8 m per minuut. Bij deze snelheid loopt de muis en hoeft de muis niet te rennen.

Op de testdag worden de muizen gevast gedurende 5 uur. Vervolgens worden de dieren aan een inspanningsprotocol onderworpen op de loopband. Twee typen inspanningsprotocollen zullen worden uitgevoerd.

Duurprotocol:

De muizen zullen eerst een warming-up doen van 15 min met een snelheid van 12 m/min. Dit komt overeen met ongeveer 50% van de maximale capaciteit. Vervolgens rennen de muizen gedurende twee uur met een snelheid van 14 m/min. Een groep controle muizen zal gedurende 2 uur op de loopband geplaatst worden zonder dat deze aan staat. Dit inspanningsprotocol geeft inzicht in de metabole veranderingen gedurende duurinspanning.

Maximaal protocol:

De muizen zullen eerst een warming-up doen van 15 min met een snelheid van 12 m/min. Na afloop van de warm-up wordt de snelheid per 1.5 minuten met 1 m/min en 1 hellingsgraad opgevoerd. Als de dieren ondanks diverse prikkels niets in staat zijn de loopbandsnelheid vast te houden omdat hun ledematen het opgeven wordt de band stopgezet. De prikkel bestaat uit het met de vinger aanrakken van de achterkant van de muis. Daarnaast wordt de muis geprikkeld wanneer hij de achterwand van de loopband toucheert, wat bestaat uit plexiglas waaraan de ruwe zijde van klittenband bevestigd is. De verwachting is dat de muizen na de warm-up na ongeveer 20-30 minuten hun maximum zullen bereiken. Een groep controle muizen zal gedurende een vergelijkbare tijd op de loopband geplaatst worden zonder dat deze aan staat. Uit het tijdstip van opgave kan de verrichte arbeid worden berekend. Dit inspanningsprotocol geeft informatie over het maximaal duurvermogen en geeft tevens inzicht in de metabole veranderingen gedurende maximale inspanning.

In het verleden zijn bovenstaande inspanningsprotocollen al met succes toegepast binnen onze onderzoeksgroep.

Bij beide inspanningsprotocollen wordt ook een controlegroep muizen meegenomen die geen inspanning doen maar wel op de stilstaande loopband geplaatst worden. Er ontstaan daardoor maximaal 4 groepen. Beide inspanningsprotocollen zullen worden uitgevoerd in muizen waarin een bepaald gen en/of signaalroute is geactiveerd of geïnactiveerd, waarbij wildtype dieren als controlegroep fungeren. Een individuele dierproef bestaat dus uit maximaal 8 groepen.

Het benodigde aantal dieren zal worden vastgesteld door middel van een poweranalyse. Mocht er onvoldoende informatie beschikbaar zijn voor een poweranalyse dan zal het aantal dieren worden bepaald op grond van eerdere vergelijkbare experimenten binnen de onderzoeksgroep of op grond van gegevens beschikbaar in de literatuur. Het streven is altijd om het aantal dieren tot een minimum te beperken, zonder concessies te doen aan een gedegen statistische onderbouwing.

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

Het benodigde aantal dieren zal worden vastgesteld door middel van een poweranalyse. Mocht er onvoldoende informatie beschikbaar zijn voor een poweranalyse dan zal het aantal dieren worden bepaald op grond van eerdere vergelijkbare experimenten binnen de onderzoeksgroep of op grond van gegevens beschikbaar in de literatuur. Het streven is altijd om het aantal dieren tot een minimum te beperken, zonder concessies te doen aan een gedegen statistische onderbouwing.

## **B. De dieren**

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

De experimenten zullen worden uitgevoerd in mannelijke muizen in de leeftijd van 3-8 maanden. De reden dat voor mannelijke muizen is gekozen is: a) omdat een groot deel van de vrouwelijke muizen vaak wordt ingezet voor de fok van de muizen; b) vanwege de in het algemene geringere variatie tussen mannelijke dieren tov. vrouwelijke dieren; c) vanwege consistentie met de literatuur en met door ons zelf in het verleden uitgevoerde experimenten. De specifieke muizenlijnen waarbij bepaalde genen en/of signaalroutes zijn geactiveerd of geïnactiveerd zullen op diverse manieren worden verkregen: 1) aankopen via commerciële dierenlabs, zoals Jackson labs of Harlan, 2) muizenlijn is al beschikbaar in dierfaciliteit, 3) verkregen via samenwerking

met een ander lab, 4) zelf vervaardigd (zie bijlage volgnummer 1).

Zoals hierboven aangegeven bestaat een individuele dierproef met inspanning op de loopband uit maximaal 8 groepen. Uitgaande van maximaal 12 muizen per groep komen we per individuele dierproef op maximaal 96 muizen. Binnen dit project willen we deze experimentele opzet maximaal 5 keer toepassen. De reden voor het lagere aantal ten opzichte van de andere onderdelen is dat niet voor alle genen en pathways die we willen onderzoeken er een effect op spier en inspanning verwacht wordt. Het geschatte aantal muizen binnen dit type experiment komt uit op maximaal 480.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

**Vervanging:** De metabole veranderingen die optreden tijdens fysieke inspanning zijn een resultaat van de interactie tussen meerdere organen, waaronder het vetweefsel, de lever en de spieren. Deze interactie tussen verschillende organen kan helaas nog niet in-vitro worden nagebootst. Om een goed beeld te krijgen van de rol van een bepaald gen en/of signaalroute bij het energiemetabolisme tijdens fysieke inspanning is het werken met proefdieren dus noodzakelijk. De aanleiding om de genen en signaalroutes verder te onderzoeken zijn overwegend in-vitro studies die een mogelijke rol van het gen of de signaalroute in het energiemetabolisme suggereren. Wanneer een vraagstelling beantwoord kan worden via in-vitro experimenten dan zal om ethische redenen altijd voor de in-vitro benadering gekozen worden.

**Vermindering:** de aantallen muizen in de verschillende studies zullen gebaseerd zijn op poweranalyses, gebruik makend van gegevens uit het verleden of uit de literatuur (indien mogelijk). Er zal voor een zo homogeen mogelijke groep muizen worden gekozen (leeftijd, geslacht, genetische achtergrond) om de variatie tussen de dieren te minimaliseren en daarmee het aantal benodigde dieren te beperken. Vermindering van het aantal proefdieren zal verder worden bereikt door de experimenten zo efficiënt mogelijk in te vullen, o.a. door hergebruik van controlegroepen (indien mogelijk).

**Verfijning:** Er zal geen gebruik worden gemaakt van de mogelijkheden die de loopband biedt om de muis tot rennen te dwingen door de muizen een kleine elektrische schok te geven op het moment dat ze van de loopband afglijden. In plaats daarvan zullen de muizen mbv. een vinger geprikkeld worden, alsmede door het toucheren van de muis van de achterwand van de loopband.

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 muizen zullen eerst voorzichtig vertrouwd worden gemaakt met de loopband voordat het werkelijke inspanningsprotocol zal worden uitgevoerd.

## 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.

Van tevoren is uitgebreid de biomedische literatuur bestudeerd om uit te zoeken of de dierproeven niet al eerder zijn uitgevoerd. In dit project bestuderen we de rol van nieuwe genen en signaalroutes die vaak nog niet of minimaal in de literatuur zijn beschreven. De belangrijkste database die wordt geraadpleegd is Pubmed, aangevuld met Google.

## 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.

Op het eind van de proef zal bloed afgenomen worden via orbitapunctie. Deze handeling zal onder isofluraan verdoving worden uitgevoerd. Om te garanderen dat de muizen volledig onder narcose zijn, zal in de gaten worden gehouden of de muizen reageren op prikkels van buitenaf.

### I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het inspanningsprotocol zal ongerief veroorzaken maar de kans dat muizen pijn zullen lijden is klein. Het ontwerp van de loopband beperkt de kans dat de muizen zich op de één of andere manier zouden kunnen bezeren.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

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

#### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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.

Het ongerief voor muizen blootgesteld aan één van beide inspanningsprotocollen is gesteld op matig. Fysieke inspanning is natuurlijk voor muizen. Afhankelijk van de stam kan de vrijwillig afgelegde loopafstand per dag variëren van enkele honderden meters tot 20 km.

### 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.

Na afloop van de proef worden de dieren opgeofferd om diverse weefsels te verzamelen. De aard van de primaire eindpunten (onder ander de expressie van diverse genen in spierweefsel) vereist dat de dieren worden opgeofferd. De weefsels die verzameld worden zullen worden gebruikt voor talloze aanvullende analyses: histologie, biochemische bepalingen, moleculaire analyses etc. Deze analyses zijn essentieel om de vraagstelling van de proef te kunnen beantwoorden.

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: AVD104002015236
2. Titel van het project: 'de rol van specifieke genen en signaalroutes in het energiemetabolisme en de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme'
3. Titel van de NTS: 'de rol van bepaalde genen in het energiemetabolisme'
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:  
De nog te erkennen DEC-Wageningen-UR; Dit is een samenvoeging van DEC-DLO en DEC-WU.  
[REDACTED]  
Secretaris: [REDACTED]
6. Adviestraject  
Ontvangen door DEC: 05-08-2015  
Aanvraag compleet: ja  
In vergadering besproken: 18-08-2015  
Anderszins behandeld: nee  
Termijnonderbreking van 24-08-2015 tot 31-08-2015 en van 03-09-2015 tot 07-09-2015 (overzetten in format CCD)  
Aanpassing aanvraag: 31-08-2015 en 07-09-2015  
Advies aan CCD: 07-09-2015
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager  
Datum vragen: 24-08-2015  
Strekking van de vragen:  
De DEC heeft vragen gesteld over:
  - Het projectplan:
    - Verheldering van de manier, waarop een van de benoemde mechanismes zal worden onderzocht;
    - Duidelijker afbakening/ definiëring van enkele gehanteerde begrippen (m.n. NAFLD);
    - Vertaalbaarheid van de resultaten, verkregen met mannelijke muizen, voor vrouwen in de humane situatie;
  - De bijlagen:
    - Aanvulling op de beschrijving bij H. (pijn en pijnbestrijding) en bij I. (Overige aantasting van het welzijn en maatregelen);
    - Toelichting op de (groeps)huisvesting (aantal dieren per kooi);
    - Toelichting op verfijning (duur van het vasten);
    - Argumentatie voor de keuze van de temperatuur bij koudeblootstelling en voor de keuze van de temperatuur, die als humaan eindpunt geldt;
    - Herkomst van de gelabelde cellen (al dan niet in dierproef/ met ongerief);
    - Een redactionele opmerking.
  - De niet-technische samenvatting:
    - Correcte vermelding van het maximale aantal te gebruiken dieren;
    - Toevoegen van een ontbrekende welzijnsaantasting.



Datum antwoorden: 31-08-2015

Strekking van de antwoorden:

De onderzoeker heeft de vragen van de DEC beantwoord en de aanvraag tot tevredenheid van de DEC dienovereenkomstig aangepast.

Op 07-09-2015 zijn de formulieren opnieuw ingediend in het format van de CCD.

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

### **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project vergunningplichtig is (dierproeven in de zin der wet).
2. 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 advisering: n.v.t.

### **C. Beoordeling (inhoud)**

1. De DEC heeft vastgesteld dat het project uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en fundamenteel van aard is.
2. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorie in overeenstemming is met de hoofddoelstellingen.
3. Het substantiële belang van het project wordt door de DEC onderschreven. Het project richt zich op de rol van specifieke genen en signaalroutes in het energiemetabolisme, de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme en op de rol van deze genen en signaalroutes bij de ontwikkeling van metabole stoornissen (zoals obesitas, diabetes, NAFLD, en hart- en vaatziekten). Het betreft een fundamenteel/ mechanistisch onderzoek met potentieel grote relevantie voor metabole ziekten.
4. De DEC stelt vast dat de expertise van de onderzoekers, de voorzieningen waar de experimenten uitgevoerd worden en de onderzoeksstrategie kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling van het project. Vrijwel alle experimentele technieken en handelingen die in de verschillende onderdelen van dit project zijn beschreven zijn al eerder uitgevoerd binnen de onderzoeksgroep. Er is inmiddels veel ervaring met deze (be)handelingen.
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren:  
Eén type dierproef is erop gericht om muizen te vervaardigen die in de overige proeven zullen worden (her)gebruikt. De dieren die worden gebruikt in de pilot om te onderzoeken of het virus inderdaad de gewenste activatie of inactivatie teweeg brengt zullen niet worden hergebruikt.  
Er worden handelingen verricht, die (veelal kortdurend) pijn kunnen veroorzaken en waarbij geen pijnstilling en/of andere pijnverlichtingsmethoden worden toegepast. Dit is voldoende beargumenteerd.  
In sommige typen dierproef worden de dieren anders dan volgens de eisen in bijlage III van de richtlijn 2010/63/EU gehuisvest (individueel). Dit is afdoende beargumenteerd.
6. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief als "matig" realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Ongerief in de experimenten zal, afhankelijk van het type dierproef bestaan uit individuele huisvesting, bloedafnames, injecties, vasten, maximale fysieke inspanning, koudeblootstelling of lichte ontsteking.
7. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. De rol van een gen bij de metabole interactie tussen diverse organen zoals vetweefsel, de lever en de spieren, kan niet in vitro worden vastgesteld. Om een goed beeld te krijgen van de rol van een bepaald gen bij het energiemetabolisme (tijdens bijv. fysieke inspanning, vasten, koudeblootstelling) is het werken met proefdieren noodzakelijk. De keuze voor de te onderzoeken genen is veelal gebaseerd

- op in-vitro- studies die een mogelijke rol van het gen in het energiemetabolisme suggereren.
8. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. De aantallen muizen in de verschillende studies zullen gebaseerd zijn op poweranalyses, gebruikmakend van gegevens uit het verleden of uit de literatuur (indien mogelijk). Er zal voor een zo homogeen mogelijke groep muizen worden gekozen (leeftijd, geslacht, genetische achtergrond) om de variatie tussen de dieren te minimaliseren en daarmee het aantal benodigde dieren te beperken. Daarnaast zullen de experimenten zo efficiënt mogelijk worden ingevuld o.a. door gebruik van één controlegroep voor meer proefgroepen (indien mogelijk).
  9. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. Om ongerief als gevolg van de individuele huisvesting te verminderen zal auditief en olfactorisch contact mogelijk worden gemaakt. Er zal gebruik worden gemaakt van kooiverrijking. De duur van het vasten zal zo kort mogelijk zijn. Van alle behandelingen wordt de duur en intensiteit zo gekozen dat het ongerief wordt geminimaliseerd. De DEC is overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
  10. De Instantie voor Dierenwelzijn heeft een positief oordeel over de kwaliteit van de aanvraag uitgebracht en de DEC heeft dit in haar overweging betrokken. Zij heeft hierbij speciale aandacht gevraagd voor het gebruik van een controlegroep met een eiwitvrij dieet.
  11. 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**

De DEC is unaniem van mening dat het doel en de haalbaarheid van het project het gebruik van proefdieren en het ongerief dat de dieren wordt aangedaan rechtvaardigt. Dilemma: De DEC signaleert, dat het project zich richt op (het bestrijden van) welvaartsziekten, waarbij de ethische vraag gelegitimeerd is, of deze niet zonder het gebruik van proefdieren zijn te bestrijden ("minder eten, meer bewegen") en of je niet beter daar je energie op zou kunnen richten. Zij is echter ook van mening, dat metabool syndroom een belangrijke ziekte is en een groot, wereldwijd probleem vormt. Zij heeft het project binnen die context besproken en geconcludeerd dat het een bijdrage kan leveren aan het vergroten van de (fundamentele) kennis over het energiemetabolisme in relatie tot het immuunsysteem en de rol die dat speelt bij metabool syndroom. Hierbij tekent zij tevens aan, dat de problematiek rond het gebruik van proefdieren t.b.v. de bestrijding van welvaartsziekten (en verslaving) een keer in een breder perspectief aan de orde gesteld moet 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

Wageningen-Universiteit



Postbus 59

6700 AB WAGENINGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer


AVD104002015236

**Bijlagen**

2

Datum 8 september 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte 

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 7 september 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD104002015236. 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](http://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

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10400  
Naam instelling of organisatie: Wageningen-Universiteit  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 9215846  
Straat en huisnummer: Akkermaalsbos 12  
Postbus: 59  
Postcode en plaats: 6700 AB WAGENINGEN  
IBAN: NL10RABO0397066465  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Wageningen UR

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: [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 december 2015  
Geplande einddatum: 30 november 2020  
Titel project: De rol van specifieke genen en signaalroutes in het energiemetabolisme en de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme  
Titel niet-technische samenvatting: De rol van bepaalde genen in het energiemetabolisme  
Naam DEC: DEC-WU  
Postadres DEC: Postbus 9191 6700 HB Wageningen  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Wageningen  
Datum: 7 september 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen-Universiteit

[Redacted]  
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  
AVD104002015236

**Bijlagen**

2

Datum 8 september 2015  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 8 september 2015  
Vervaldatum: 8 oktober 2015  
Factuurnummer: 15700236  
Ordernummer: WUR888369

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD104002015236	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.

[REDACTED]

---

**Van:** DEC <dec@wur.nl>  
**Verzonden:** maandag 5 oktober 2015 16:36  
**Aan:** Info-zbo  
**Onderwerp:** RE: vraag betreffend advies AVD104002015236

**Categorieën:** Dossier: [REDACTED]

Beste mevrouw [REDACTED]

Het lijkt er inderdaad op, dat er sprake is van verwarring met een ander projectvoorstel. Er wordt geen eiwitvrije controlegroep gebruikt in onderhavig project. Excuus voor deze vergissing.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Secretaris DEC WUR

---

**Van:** Info-zbo <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)>  
**Verzonden:** maandag 5 oktober 2015 16:28  
**Aan:** DEC  
**Onderwerp:** vraag betreffend advies AVD104002015236

Geachte secretaris van DEC WUR,

Bij de behandeling van projectaanvraag AVD104002015236 getiteld: "de rol van specifieke genen en signaalroutes in het energiemetabolisme en de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme" waarover uw DEC advies aan de CCD heeft uitgebracht, hebben wij nog een vraag aan u. Op het formulier bij punt C (beoordeling) punt 10. Refereert u aan het oordeel van de IvD waarin speciaal aandacht wordt gevraagd voor het gebruik van een controle groep met eiwitvrij dieet.

Voor zover wij hebben kunnen nagaan wordt in geen van de bijlages dierproeven eiwitvrij dieet gebruikt. Kunt u dit nader toelichten, of is hier sprake van een verwarring met een ander projectvoorstel?

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)  
.....  
Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
.....



T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)<mailto:info@zbo-ccd.nl> (let op: nieuw emailadres!)



## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Wageningen-Universiteit

Postbus 59  
6700 AB WAGENINGEN

### Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 20401  
2500 EK Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

T 0900-28 000 28 (10 ct /min)  
[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD104002015236

**Uw referentie**

**14 OKT. 2015**

Datum:

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**  
1

Geachte [REDACTED]

Op 7 september 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De rol van specifieke genen en signaalroutes in het energiemetabolisme en de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme" met aanvraagnummer AVD104002015236. 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 tweede voorwaarde is een algemene voorwaarde die wordt gesteld aan langjarige projecten om te voldoen aan datgene wat voortvloeit uit artikel 10 van de wet. U kunt met uw project "De rol van specifieke genen en signaalroutes in het energiemetabolisme en de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 december 2015 tot en met 30 november 2020.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-WU gevoegd. Dit advies is opgesteld op 7 september 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 5 oktober 2015 heeft de DEC gereageerd op onze vragen. In het DEC advies wordt gerefereerd aan een eiwit vrij dieet. De DEC heeft bij navraag bevestigd dat dit om een verschrijving gaat. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering.

Dit 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 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.

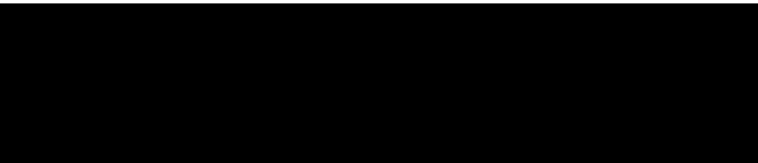
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

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

**Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: Wageningen Universiteit  
Adres: Postbus 59  
Postcode en woonplaats: 6700AB Wageningen  
Deelnemersnummer: 10400

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 december 2015 tot en met 30 november 2020 voor het project "De rol van specifieke genen en signaalroutes in het energiemetabolisme en de interactie tussen het immuunsysteem en het energiemetabolisme" met aanvraagnummer AVD104002015236, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-WU.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 7 september 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 7 september 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 7 september 2015;
  - c. Advies van dierexperimentencommissie d.d. 7 september 2015, ontvangen op 7 september 2015;

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Vervaardiging van muizen waarin een bepaald gen of signaalroute geactiveerd of geïnactiveerd is met behulp van adeno-associated virus	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / wild type	100	Licht / mild
Hoogvetdieet als stressor voor ophelderen functie van genen	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) wild type + genetisch gemodificeerd	960	Matig / moderate
Vasten als stressor voor ophelderen functie Van genen	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) wild type of genetisch gemodificeerd	720	Matig / moderate
Koude blootstelling als stressor voor ophelderen functie van genen	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) wild type of genetisch gemodificeerd	768	Matig / moderate
Activatie van het immuunsysteem als stressor voor ophelderen functie van genen en pathways	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) wild type of genetisch gemodificeerd	768	Matig / moderate
Fysieke inspanning als stressor voor ophelderen functie genen	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) wild type of genetisch gemodificeerd	480	Matig / moderate

**Datum**  
14 oktober 2015  
**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD104002015236

### **Voorwaarden**

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

De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go beslissingen worden genomen met instemming van de IvD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning.

Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving 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 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

**Datum**  
14 oktober 2015

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD104002015236

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.

[REDACTED]

---

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 14 oktober 2015 12:57  
**Aan:** [REDACTED]  
**CC:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Beschikking AVD104002015236  
**Bijlagen:** Beschikking 236.pdf

Geachte heer, mevrouw,

Deze beschikking is ook per post verstuurd.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)  
Nationaal Comité advies dierproevenbeleid [www.ncadierproevenbeleid.nl](http://www.ncadierproevenbeleid.nl)

.....  
Bezuidenhoutseweg 73 | 2594 AC | Den Haag Postbus 20401 | 2500 EK | Den Haag  
.....



Inventaris Wob-verzoek W16-07S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2015338</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel oud				x		x	x	
3	Niet-technische samenvatting oud			x					
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1 oud				x		x	x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud				x		x	x	
6	DEC-advies				x		x	x	
7	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
8	Mail vragen DEC 21-12-2015				x		x	x	
9	Reactie vragen DEC			x					
10	Mail reactie onderzoeker 22-12-2015				x		x	x	
11	Projectvoorstel herzien				x		x	x	
12	Bijlage beschrijving dierproeven 1 herzien				x		x	x	
13	Bijlage beschrijving dierproeven 2 herzien				x		x	x	
14	Niet-technische samenvatting herzien	x							
15	Advies CCD		x						x
16	Beschikking en vergunning				x		x	x	
17	Mail terugkoppeling DEC 28-1-2016				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](http://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   10500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Rijksuniversiteit Groningen
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[Redacted]
		KvK-nummer	1179037
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1, [Redacted]
		Postbus	
		Postcode en plaats	9713AV   Groningen
		IBAN	NL80ABNA0446049352
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[Redacted]
		Afdeling	[Redacted]
		Telefoonnummer	[Redacted]
		E-mailadres	[Redacted]

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |               |
|------------|---------------|
| Startdatum | 1 - 12 - 2015 |
| Einddatum  | 1 - 12 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- To change the course of chemotherapy-induced mucositis
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Het voorkomen of verminderen van ontsteking aan de darmwand veroorzaakt door chemotherapie.
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                             |
|-------------|-----------------------------|
| Naam DEC    | DEC-RUG                     |
| Postadres   | A. Deusinglaan 1 [REDACTED] |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl        |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741,00 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

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


## 6 Ondertekening


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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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


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

Naam 

Functie 

Plaats Groningen

Datum 25 - 11 - 2015

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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

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

### 2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
- Research aimed at preserving the species subjected to procedures
- Higher education or training
- Forensic enquiries

### 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.
- 

Survival of children with cancer has increased significantly over the last decades, due to more intensive treatment protocols. The disadvantage of these more intensive chemotherapy treatment protocols is a higher frequency of side effects. One of these side effects is gastrointestinal mucositis (hereafter mucositis); a complex inflammatory reaction of the mucous membranes of the alimentary tract. Mucositis develops via different biological stages resulting in villus atrophy, ulceration and loss of barrier function, ending with spontaneous healing. The patients suffer from vomiting, abdominal pain, diarrhea, weight loss and are at increased risk of developing a bacteremia or sepsis. Mucositis leads to a lower quality of life and an increased morbidity and mortality. So far no interventions are found which prevents or to treat GI mucositis.

In this project we aim to change to course of chemotherapy-induced mucositis. To be able to achieve the aim, both fundamental and translational research is required.

Mucositis is a complex multifactorial process with many different established contributors (intestinal epithelium, immune system and nutrition). Based on these contributors a 5-phase model was developed for the pathobiology of oral mucositis.<sup>1</sup> This model is also the basis for the pathobiology of gastrointestinal mucositis. However, as one can imagine the environment in the intestine is markedly different from the oral environment, and thus the pathophysiology of gastrointestinal mucositis is probably (slightly) different. In short, the 5-phase model describes an initiation phase during which nuclear factor kappa B (NFκB) is activated by the formation of reactive oxygen species (ROS) and the occurrence of damage to the DNA. This is followed by the primary damage response phase during which messenger molecules / cytokines (among others: tumour necrosis factor α (TNFα)) are induced which lead to tissue inflammation and apoptosis. In the amplification phase the messenger molecules / cytokines are amplified due to positive feedback loops leading to increased inflammation and apoptosis. During the ulcerative phase the epithelial barrier integrity is lost due to the apoptosis and intestinal damage, which is spontaneously healed during the healing phase. However, in the gut there are other possible contributors which need to be explored for example the gut microbiota.<sup>2,3</sup> These microbiota have been reported to play a role in gastrointestinal mucositis in several studies so far.

In this project we will do fundamental research into a possible contributor which is not included in the 5-phase model, the gut microbiota.<sup>2</sup> The gut is in a continuous state of low grade infection due to the interactions between the gut microbiota and the immune system. Previous research has shown there is a change in microbial composition of the microbiota after chemotherapy, coinciding with gastrointestinal mucositis.<sup>3</sup> These changes in the microbiota potentially influence the inflammatory reaction seen during mucositis, since a change in composition of the gut microbiota would also alter the balance in the continuous state of low grade infection in the intestine. Interventions aimed to influence the composition of the gut microbiota could positively influence the course of mucositis by promoting a healthy composition of the microbiota, which could restore the normal state of low-grade inflammation in the intestine.

---

The second component we want to investigate in this project are interventions aimed to influence the inflammatory response and/or improve the intestinal barrier. The 5-phase model is mainly revolved around the inflammatory reaction present during mucositis. Drugs which influence this inflammatory reaction can potentially influence the course of gastrointestinal mucositis by reducing the damage done by the inflammation. An integral part of the damage done during mucositis is the ulceration phase, during which the patient suffers from the loss of the barrier function. Therapies which improve the barrier function by for example promoting proliferation, reducing apoptosis, improving cell junctions and/or preventing cellular changes, could reduce or prevent the damage to the intestinal barrier which is the main problem for the patient.

The last component we will investigate are nutritional based interventions. In previous research performed by our group the absorption of different components of the nutrition during mucositis were investigated.<sup>4</sup> Nutrition is known to be able to influence the barrier function of the intestine during mucositis and other intestinal complications. In this study we will continue investigations into potential nutritional interventions which improve the barrier function and could help speed up the recovery after the ulceration phase.

A strength of this study is the potential of the different components of the study to influence each other. The nutrition is for example known to influence the composition of the microbiota, which could lead to double beneficial effects.

The model we developed and will use in this project is well validated and suitable to test interventions based on the results of our basic research. Therefore, during this project translational research will be performed to study whether we can change the course of chemotherapy-induced mucositis.

(1) [REDACTED]

(2) [REDACTED]

(3) [REDACTED]

[REDACTED]

(4) [REDACTED]

[REDACTED]

---

### 3.2 Purpose

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

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

---

The main objective of this project is to find prevention or treatment strategies which change the course of severe mucositis. To achieve this objective several potential strategies will be investigated namely, the gut microbiota, therapies/prophylaxis and nutrition. Also the mechanism behind the interventions will be investigated.

We deem the aim of this project feasible within the duration of this project. In previous projects the chemotherapy-induced mucositis rat model which we will use in this project was developed. The model is now well validated and there is a tremendous amount of experience with the model.<sup>1-4</sup> The project consists of different research avenues which will be investigated simultaneously with good communication between the different contributors. The combination of the different areas of research and combination of knowledge gained within each area will help us achieve the aim of the project.

---

### 3.3 Relevance

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

---



Previous research has shown that 55% of the children receiving chemotherapy develop intestinal mucositis. On top of that when patients were asked the most debilitating side-effect of chemotherapy, symptoms of mucositis were mentioned the most. The overall consequences of the mucositis not only involves quality of life after chemotherapy courses, but probably also decreases survival due to treatment reduction, treatment delay, decreased nutritional state, which on its own is associated with treatment complications and increased mortality. Up until now there are no interventions in place which prevent or improve the course of mucositis, which we want to change with this project.

(1) [REDACTED]

(2) [REDACTED]

(3) [REDACTED]

(4) [REDACTED]

### 3.4 Research strategy

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

This projects aims to change the course of chemotherapy-induced mucositis and their mechanism of action. Different potential prevention or treatment strategies will be assessed in a chemotherapy-induced mucositis rat model.

The first strategy is to investigate the relevance of intervening at the level of the gut microbiota. The pathophysiology of the possible relationship between the GI microbiota and mucositis has been extensively reviewed in a paper of our research group. However, little research to investigate the relationship has been done until this point. We investigated the microbiota of pediatric acute myeloid leukemia (AML) patients, which demonstrated a significant decrease in the total number and a change in composition of the fecal bacteria. This result was replicated in a rat model of chemotherapy-induced mucositis by our group and by others. The relationship between the microbiota and the development and recovery of mucositis and possible interventions is the first possible strategy investigated here. Possible interventions for the microbiota are among others antibiotics to limited potential pathogenic bacteria, pro- and prebiotics to promote a 'healthy' population of the microbiota or a combination of the different interventions.

Secondly, interventions aimed to influence the inflammatory response and/or improve the intestinal barrier will be investigated. Previous research has shown the beneficial effects of inhibition of several cytokines (among others [REDACTED])<sup>1</sup> Here, we will continue to investigate drugs which influence the inflammatory response during mucositis and further elucidate important components of the inflammatory response during mucositis. [REDACTED]

[REDACTED]<sup>2</sup> Another important feature in the previously mentioned 5-phase model is the disruption of the intestinal barrier during the ulceration phase. Interventions aimed to improve the intestinal barrier will be investigated in this study. One approach to improve the barrier function is to limit cell death, this can be accomplished to reduce apoptosis or via increased proliferation of the intestinal epithelial cells. Another approach is to improve the barrier function by interventions aimed at the cellular junctions. Increasing the amount or strength of the cellular junctions (for example tight junctions) between the epithelial cells, the disruption of the intestinal barrier might be prevented or limited. A possible mechanism to upregulate the tight junction proteins is stimulation of cannabinoid type 2 receptor which was investigated by Yang et al.<sup>3</sup>

A third possible strategy are interventions based on the nutrition. Previous research in our group has focused on feeding strategies based on parental nutrition or tube feeding strategies and the uptake of nutrients. In this study we will continue investigating optimal feeding strategies, on top of that we will also investigate nutritional interventions focused on supplementation of the intake. [REDACTED]

The three previously mentioned strategies are closely related, as the interventions investigated could also have an effect on other components. Nutrition is known to influence the microbiota composition in the gut and there is a link between the microbiota and the inflammatory response present, as the intestine is in a constant state of low grade inflammation due to interactions between microbiota and immune system. Therefore, combinations of effective interventions could be investigated to show whether the combination has an additive or synergistic effect on the course of severe mucositis.

To investigate the mechanism behind successful strategies we would like to have knock-outs available. The availability of knock-out rats is far from complete compared to mice. Therefore, we would like to transpose our chemotherapy-induced mucositis rat model into a mouse model to be able to investigate proposed mechanisms for the interventions. As described above, the interaction between the gut microbiota and the immune system is important for the development of mucositis. Therefore, we will study knock out models of genes encoding for receptors which are important for the interaction of this interaction (for example [REDACTED]). On the other hand the inflammatory response could be hypothesized to be the major contributor to the development of mucositis and a knock-out of a central gene (for example [REDACTED]) could reduce the severity of the mucositis. More genes of interest will be decided during the course of the study, depending on new literature and results of above mentioned studies.

The three different research strategies will all be started simultaneously and continue over the course of the entire project. The exact planning of these experiments is hard to predict since the outcomes of earlier experiments taken into account in the development and planning of new experiments. The development of the mouse model will most likely start in year two.

- (1) [REDACTED]
- (2) [REDACTED]
- (3) [REDACTED]

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

The different components of the project will all employ the rat model of chemotherapy-induced mucositis which is a well validated model that has been developed and further employed in previous projects.<sup>1-4</sup> The last part of the project which tries to elucidate the mechanisms of different interventions will be performed in both our established rat model and a mouse model which is to be developed. The mouse model will be developed to have knock-outs available since in rats the knock-outs are limited.

For the first component of the study the chemotherapy-induced rat model of mucositis will be employed during which the relationship between the mucositis and the gut microbiota will be elucidated. To investigate this relationship different experiments will be performed during which (part of) the microbiota is depleted using antibiotics, bacterial strains will be added using probiotics, prebiotics will be given to modulated the composition of the gut microbiota or the effect of the gut microbiota will be mimicked.

The second component aims to prevent or elevate the mucositis by improving of cell survival, limiting inflammation or via other mechanisms. During these experiments the animals will be (prophylactically) treated with drugs which for example could improve cell survival, promote cell proliferations, limit apoptosis or limit inflammation.

The third component aims to intervene in the nutrition. [REDACTED]

The chemotherapy-induced mucositis mouse model will assess mechanisms of successful strategies which require knock-outs or other tests currently unavailable in rats. The development of the mouse model will most likely start in year two.

(1) [REDACTED]

(2) [REDACTED]

(3) [REDACTED]

(4) [REDACTED] WJ, Stellaard F, Verkade HJ, Rings EH. Reduced absorption of long-chain fatty acids during methotrexate-induced gastrointestinal mucositis in the rat. Clin Nutr 2013 Jun; 32(3): 452-459.

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 components all have the goal to change the course of severe mucositis and the interventions are designed to target different factors which could influence the course of mucositis. However, the influence of each of the component is not limited to the component itself. Changes in nutrition also have an influence on the composition of the microbiota and could possibly also improve cell survival. The composition of the microbiota is also known to influence the inflammation in the intestine. Therefore, the different components of the project are closely linked together.

Interventions which improve the course of chemotherapy-induced mucositis will be selected and interventions combined if possible to investigate possible synergistic effects.

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	Chemotherapy-induced mucositis rat model
2	Chemotherapy-induced mucositis mouse model
3	
4	
5	
6	
7	

8	
9	
10	



## Format

### Niet-technische samenvatting

- Dit format gebruikt u om uw niet-technische samenvatting te schrijven
- Meer informatie over de niet-technische samenvatting vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl).
- Of neem telefonisch contact op. (0900-2800028).

## 1 Algemene gegevens

- 1.1 Titel van het project | Het voorkomen of verminderen van ontsteking van de darmwand veroorzaakt door chemotherapie.
- 1.2 Looptijd van het project | 01-12-2015 tot 01-12-2020
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Chemotherapie, darmwandontsteking, kanker, mucositis

## 2 Categorie van het project

- 2.1 In welke categorie valt het project.
- 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
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*

### 3 Projectbeschrijving

- |   |   |
|---|---|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | De overleving van kinderen met kanker is de laatste decennia enorm verbeterd, dit door zwaardere behandelmethodes. Het nadeel van deze zwaardere chemotherapie is dat er vaker bijwerkingen zijn. Een van de belangrijkste bijwerkingen van chemotherapie is een ontsteking van de darmwand, genaamd mucositis. Mucositis zorgt voor diarree en buikpijn. Als de diarree te ernstig wordt, kan de geplande behandeling met chemotherapie niet meer uitgevoerd worden. Dit beïnvloedt de kans op overleving. Bovendien verlaagt mucositis de kwaliteit van leven van het kind met kanker dramatisch. In dit project willen we proberen mucositis te voorkomen of sneller te genezen. Dit doen we door ons te richten op verschillende mogelijke therapieën. We willen de invloed van de darmbacteriën op de mucositis onderzoeken en kijken of deze gebruikt kunnen worden voor een therapie. Tevens gaan we onderzoek doen naar farmaca die ervoor kunnen zorgen dat het darmepitheel kan overleven en/of de ontsteking in de darm minder wordt. Als laatste wordt onderzocht of met toevoegingen aan de voeding de ernst van mucositis kan worden verminderd en het herstel verbeterd. |
| 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?         | In dit project willen we nieuwe therapieën vinden die het ziekteproces kunnen verminderen van mucositis die ontstaat door chemotherapie. Uit eerder onderzoek bleek dat meer dan de helft van de kinderen die chemotherapie kregen mucositis ontwikkelde. Daarbij gaven patiënten aan dat ze de symptomen die ontstaan door mucositis ervaren als de ergste bijwerking van chemotherapie. Doordat mucositis ook de overleving kan beïnvloeden door noodzakelijke veranderingen in het behandelingschema, zou een therapie die mucositis kan voorkomen of het herstel kan versnellen een enorme verlichting zijn voor de patiënten. De uitkomsten uit dit project kunnen gebruikt worden om nieuwe therapieën bij mensen te ontwikkelen.   |
| 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?  | Tijdens de vier jaar van dit project zijn naar schatting 720 ratten nodig (drie experimenten per jaar met elk 48 ratten). Ook willen we het model opzetten in muizen. De belangrijkste reden hiervoor is dat er in muizen stammen beschikbaar zijn die één gen missen (knock-outs). Die kunnen gebruikt worden om te bewijzen hoe de nieuwe therapie werkt. Omdat het muismodel nog ontwikkeld moet worden is het lastig om een schatting te geven van het aantal. De experimenten met muizen zullen echter vooral uitgevoerd worden als succesvolle therapieën zijn ontwikkeld in het ratmodel. We schatten dat er 360 muizen nodig zijn voor het opzetten en uitvoeren van de experimenten.   |
| 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?   | Het grootste negatieve effect voor de proefdieren is het onder narcose toegediend krijgen van een chemotherapeutikum (bijv. methotrexaat) en de daaruit volgende mucositis. Hierdoor zijn de dieren vier dagen ziek (minder eten en diarree). Daarna herstellen de dieren van de mucositis. Andere negatieve gevolgen zijn het onder narcose afnemen van bloed, vasten voor een test om de opname uit de darm te testen en een druppelje bloed afnemen als onderdeel darmopname test.   |
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?   | Matig   |
| 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?   | De dieren zullen worden geofferd aan het einde van de proef. Dit is nodig om de ernst van de mucositis te beoordelen en om darminhoud te verzamelen zodat we de bacteriën in de darm kunnen onderzoeken.  |

## 4 Drie V's

### 4.1 **Vervanging**

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

Mucositis is een multifactorieel proces. Er zijn zoveel verschillende onderdelen in het lichaam die er invloed op hebben (darmwand, immuunsysteem, voeding, darmflora) dat dit niet in vitro (d.w.z. in weefsel buiten het lichaam) nagebootst kan worden. Bovendien is het onderzoek te invasief om het in de humane situatie uit te voeren.

### 4.2 **Vermindering**

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

Voor elk experiment zal het aantal benodigde dieren met statistische analyses beperkt worden. Waar mogelijk worden methoden gebruikt waarbij het offeren van de dieren niet nodig is. Hetzelfde dier kan dan op meerdere momenten gemeten worden.

### 4.3 **Verfijning**

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

Het ratmodel dat we in deze studie zullen gebruiken, is goed gevalideerd. Het is een model dat vaak gebruikt wordt bij onderzoek naar mucositis door chemotherapie. Ook is bekend dat de ratten in dit model herstellen van de chemotherapie. Dit is in andere modellen die gebruikt worden niet het geval.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de

Het model is zo ingericht dat de ratten herstellen van de chemotherapie die gegeven wordt. Tijdens het toedienen van de chemotherapie zullen de dieren onder narcose gebracht worden om zo het ongerief voor de dieren te verminderen. De experimenten worden uitgevoerd door bevoegd en competent personeel.

[

proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

---

**5** In te vullen door de CCD

Publicatie datum

---

Beoordeling achteraf

---





## 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](http://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'.	10500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Rijksuniversiteit Groningen	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	Chemotherapy-induced mucositis rat 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.

To assess the course of chemotherapy-induced mucositis a rat model was developed previously in our department.<sup>1</sup> To be able to investigate the chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis (hereafter mucositis) the rats in our model receive an injection of a chemotherapeutic agent (for example methotrexate (MTX), irinotecan or other chemotherapeutics) after which the mucositis can be investigated. Initially the focus will be on MTX as the chemotherapeutic agent, later on other chemotherapeutics will be investigated as well since the effect of interventions might be different depending on the

mechanism of action of the chemotherapeutic agent. During a bout of mucositis the rats will develop diarrhoea, reduce their food intake and as such reduce in body weight. These parameters will be measured throughout the whole experiment.

To study different feeding strategies currently used in patients (parental feeding and tube feeding) a rat model with a catheter into the vena jugularis or the duodenum was developed. These rats will receive surgery during which they received a permanent catheter in the duodenum or vena jugularis which will be subcutaneously tunnelled to the head, where attachment to the swivel system is possible. The swivel system is used to continuously infuse parenteral or tube feeding. After the operation which places the catheter the rats receive analgesics for 24 hours and are enabled to recover for seven days. The dose of the chemotherapeutics in this model is lowered since the animals are under increased stress due to the catheter.

#### Primary outcome measures:

- Histology of the intestine: To determine the severity of mucositis, the histology of the intestine will be investigated. The histology will be measured on time points of interest when animals are sacrificed.
- Blood citrulline levels: To reduce the amount of animals needed the blood levels of citrulline and/or other (blood) markers will be measured during the experiment. Citrulline is an amino-acid almost exclusively produced by enterocytes, the blood levels of citrulline are a marker for the enterocyte mass in the intestine.
- Gut microbiota: To investigate the gut microbiota, intestinal content will be collected in which the microbiota will be measured. However, this is only possible after animals are sacrificed. Therefore, faeces will be collected to investigate the gut microbiota during the experiment.
- Glucose absorption: Before the rats will be sacrificed they will be fasted overnight and a glucose absorption test will be performed, this test is performed to test the intestinal function.

(1) [REDACTED]

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

In general the previously mentioned chemotherapy-induced rat model will be employed to investigate the effect of different interventions before and/or after administration of the chemotherapeutic agent. The mentioned model is optimized with the use of methotrexate as chemotherapeutic agent. When other chemotherapeutic agents will be used the dose is based on literature and optimized in pilots.

#### Intervention studies will be carried out with:

- Anti-, Pro-, pre- or synbiotics. These are interventions aimed to enlarge the bacterial population of the microbiota and/or to change its composition. Antibiotics will be aimed to reduce the populations of potentially pathogenic bacteria, these can be given in the food/drinking water or via oral gavage. Probiotics are one or more bacterial strains which are given via oral gavage, prebiotics are substances [REDACTED] which can be given in the food/drinking water or via oral gavage and synbiotics are a combinations of the two. Depending on the aim of the experiment these will be given once or multiple times during the experiment.
- Drugs aimed to influence the inflammatory response. These drugs will most likely be given via an (intravenous, intraperitoneal or subcutaneous) injection, depending on the optimal route of the intervention, as a prophylaxis or therapy. With these studies we aim to influence the inflammatory response in a beneficial way to limit the damage done during mucositis or to fasten the recovery ([REDACTED]).
- Drugs targeting the intestinal barrier. Drugs improving the intestinal barrier will also most likely be given via an injection, although certain drugs could potentially be given via oral gavage or in the food/drinking water, given as prophylaxis or therapy. These drugs aim to prevent or limit the disruption of the intestinal barrier during the ulceration phase of mucositis ([REDACTED]).

- Nutrition. Nutritional interventions include both feeding strategies and supplementation to food/water.

The chemotherapeutic agent will be administered under general anaesthesia and the rats are followed during the development and recovery of mucositis. Throughout the whole experiment body weight, intake and the presence of diarrhoea are measured. During the experiment blood samples will be taken daily or every other day to measure blood levels of citrulline and/or other biomarkers. Faecal samples will be collected to investigate the gut microbiota during the experiment. Animals will be sacrificed on points of interest which depend on the aim of the experiment.

During some experiments animals might receive two cycles of chemotherapy to investigate the effect of successful interventions during a second cycle of chemotherapy. The effect of successful intervention during two cycles will be investigated since patients also receive multiple during the treatment of their tumour.

The night before the animals are sacrificed the animals are fasted since this is needed to perform a glucose absorption test to investigate the function of the intestine. For this test the animals receive a bolus of labelled glucose via oral gavage and the blood glucose levels will be monitored via repeated collection of blood via the tail vein.

---

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

Before each experiment a sample size calculation based on a power assessment with historical data from our laboratory (expected effect size and standard deviation of histology, blood citrulline levels, etc) will be performed to determine the group size of the animals. To reduce the amount of animals needed, the course of chemotherapy-induced mucositis will in general be monitored by blood citrulline levels, while histology is performed on a time point of interest.

---

## **B. The animals**

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

We chose wild-type Wistar male rats as animal model in this project since in preceding projects a chemotherapy-induced rat model was developed. This is a validated model and the model is very suitable for the experiments planned in the present project. The model is optimized for male rats during the development of the model, which means the dose in this model is most likely not optimized for female rats. On top of that, the fact that mucositis is a multifactorial in their development adding another variable (male vs female) into the equation would increase the variation too much.

The rats in our experiments will be purchased from commercial sources both from inside and outside of the EU. The life stage of the animals is post-weaning and young adults depending on the aim of the experiment. We estimate that approximately 8 rats are required for each experimental group in which mucositis is induced. The exact number of rats needed for each experiment will be calculated with a sample size calculation based on historical data from our laboratory and a power assessment. With these group sizes, the estimation that each experiment has 3 groups with 2 time points and the estimation of 3 experiments each year of the five years of this project leads to an estimated number of 720 animals needed.

---

## **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

#### **D. Replacement, reduction, refinement**

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

Replacement: The goal of this project is to ameliorate the course of chemotherapy-induced mucositis. Mucositis is a multifactorial process which involves many different established contributors (intestinal epithelium, immune system and nutrition) which are hard to mimic in vitro. On top of that we will investigate the role of the intestinal microbiota. Therefore, an accurate in vitro model which combines all these factors is impossible to accomplish. The experiments are clearly too invasive to be able to investigate them in the human situation. Therefore, an animal model of chemotherapy -induced mucositis is needed.

Reduction: Experiments during which animals are sacrificed at two or more time points compared to the control group(s) will, when the experimental aim allows this, not be measured on each time point since the control animals do not change during the experiment. Also parameters which do not require the animals to be sacrificed are assessed whenever appropriate, for example citrulline in blood samples and faeces samples.

Refinement: The animal model employed in this project is a well validated model in which the development and recovery of mucositis can both be studied. Anaesthesia and analgesia will be used whenever appropriate to minimize stress and discomfort.

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

The animals are handled often to minimize stress and discomfort during weighing or while being transferred. On top of that, animals are monitored frequently to identify potential discomfort as soon as possible. Anaesthesia and analgesia are given whenever needed. Potential environmental-polluting waste will be collected appropriately.

### **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.

Several possible interventions are investigated which could potentially ameliorate the course of severe mucositis. The role of microbiota during the development and recovery of chemotherapy-induced mucositis has not yet been extensively investigated. The research that has been done so far showed potential but due to flaws in the experimental design results are not solid enough to allow direct translation to humans. Some studies report nutritional

interventions. However, these studies have so far focused on amino acid supplementation, other nutrients or combinations have hardly been studied.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III 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 will be housed individually. This is needed since group housing increases stress and in the model the increased stress leads to worsening of the symptoms. In turn this also leads to more variability between rats. Also the catheterized animals require individual housing due to the connection to a swivelsystem.

### 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 rats will be anesthetized with Isoflurane/oxygen by or under supervision of experienced employees. Analgesia will be used after the catheterization and whenever needed at other moments.

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

After administration of the chemotherapeutic agent the rats will have 4 days of lowered food intake, weight loss (<10%), diarrhoea and general sickness.

Also in the catheter model there is increased stress on the animals, which potentiates effects of mucositis. Therefore, the dose of chemotherapeutics is lowered in this model.

Explain why these effects may emerge.

The goal of our project is to change the course of chemotherapy-induced mucositis, the symptoms of mucositis are an impaired uptake of nutrients and a general sickness. Due to an impaired uptake of nutrients more water will be attracted to the faeces which results in diarrhoea. Combined the general sickness and diarrhoea lead to weight loss.

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

Chemotherapy will be given at a dose which ensures the mucositis is self-limiting as it is in patients. This dose is optimized to minimize severity and suitable to investigate mucositis. The interventions which are investigated are aimed to prevent occurrence or minimise severity of the mucositis.

#### **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.

When signs of severe complications, like severe weight loss (>15%) and general severe malaise (behavior, fur, hygiene) the rats will be sacrificed due to humane endpoints. After injection with the chemotherapeutic agent the rats will be investigated daily.

Indicate the likely incidence.

<5% of the animals receiving chemotherapy.

#### **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').

Non-recovery: collection of organs after being sacrificed

Mild: individual housing, transport during experiments, oral gavage, collection of blood from tail vein, injection of intervention (IV,IP,SC), dexamethasone or nuclear magnetic resonance spectroscopy, faecal transfer, repeated collection of blood during glucose absorption test, fasting and continuous infusion of parenteral or tube feeding.

Moderate: Administration of chemotherapy/NaCl via injection, experiencing mucositis and placement of permanent catheter into the vena jugularis or duodenum.

The overall expected level of discomfort is moderate. The animals will be closely monitored after administration of chemotherapy until the end of 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.

To be able to investigate the histology of the intestine to evaluate the mucositis and its recovery and to collect the content of the gastrointestinal tract to

evaluate the gut microbiota. Other organs are also investigated and harvested depending on the research question.

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

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

Yes



5

## 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](http://www.zbo-ccd.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

#### 1 General information

- 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.
- 1.2 Provide the name of the licenced establishment.
- 1.3 List the serial number and type of animal procedure.
- | Serial number | Type of animal procedure                   |
|---------------|--|
| 2             | Chemotherapy-induced mucositis mouse 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.

Since the aim with the mouse model is to replicate the results from the rat model to have knock-outs available, the mouse model will be designed to be as similar as possible to the rat model as possible given the differences between the two species. Therefore, there will be overlap between the outcome measures and interventions possibly performed in both models.



The main reason to develop a chemotherapy-induced mucositis mouse model is the availability of transgenic mouse models enabling mechanistic studies of causes of mucositis. The mouse model will be developed based on available literature combined with experience we have with the rat model. Based on literature a suitable mouse strain will be selected and an approximate chemotherapy dose will be determined to be given IV and in a single dose. The dose will be optimised in several experiments to ensure minimal severity for the mouse, combined with a suitable model to investigate mucositis.

To be able to investigate the chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis (hereafter mucositis) the mice in our model will receive an injection of a chemotherapeutic agent (for example methotrexate, irinotecan or other chemotherapeutics) after which the mucositis can be investigated. During a bout of mucositis the mice will develop diarrhoea, reduce their food intake and as such reduce in body weight. These parameters will be measured throughout the experiments.

Primary outcome measures:

- Histology of the intestine: To determine the severity of mucositis, the histology of the intestine will be investigated. The histology will be measured on time points of interest when animals are sacrificed.
- Blood citrulline levels: To reduce the amount of animals needed the blood levels of citrulline and/or other (blood) markers will be measured during the experiment. Citrulline is an amino-acid almost exclusively produced by enterocytes, the blood levels of citrulline are a marker for the enterocyte mass in the intestine.
- Gut microbiota: To investigate the gut microbiota, intestinal content will be collected in which the microbiota will be measured. However, this is only possible after animals are sacrificed. Therefore, faeces will be collected to investigate the gut microbiota during the experiment.
- Glucose absorption: Before the rats will be sacrificed they will be fasted overnight and a glucose absorption test will be performed, this test is performed to test the intestinal function.

---

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

When the mice model is successfully developed and optimized, the model will be used to investigate the effect of different interventions before and/or after administration of the chemotherapeutic agent.

The main objective in the mouse model will be to confirm improved results found in the rat model and to investigate a genetic involvement in the mechanism of action. Intervention studies will be carried out with:

- Knock-out genes. To investigate the proposed mechanisms of successful interventions an important tool is the use of transgenic mice. The interaction between the gut microbiota and the immune system is important for the development of mucositis. Therefore, we will study knock out models of genes encoding for receptors which are important for the interaction of this interaction (████████████████████). On the other hand the inflammatory response could be hypothesized to be the major contributor to the development of mucositis and a knock-out of a central gene (████████████████████) could reduce the severity of the mucositis. More genes of interest will be decided during the course of the study, depending on new literature and results of above mentioned studies.

Since the mouse model will be employed to investigate genetic involvement in the mechanism of action of the interventions which were successful, we will need to confirm whether these interventions are successful in mice as well.

- Pro-, pre or synbiotics. These are interventions aimed to enlarge the bacterial population of the microbiota and/or to change its composition. Probiotics are one or more bacterial strains which are given via oral gavage, prebiotics are substances (████████████████████) which can be given in the nutrition or via oral gavage and synbiotics are a combinations of the two. Depending on the aim of the experiment these will be given once or multiple times during the experiment.

- Drugs aimed to influence the inflammatory response. These drugs will most likely be given via an (intravenous, intraperitoneal or subcutaneous) injection, depending on the optimal route of the intervention, as a prophylaxis or therapy. With these studies we aim to influence the inflammatory response in a beneficial way to limit the damage done during mucositis or to fasten the recovery ( [REDACTED] ).
- Drugs targeting the intestinal barrier. Drugs improving the intestinal barrier will also most likely be given via an injection, although certain drugs could potentially be given via oral gavage or in the food/drinking water, given as prophylaxis or therapy. These drugs aim to prevent or limit the disruption of the intestinal barrier during the ulceration phase of mucositis ( [REDACTED] ).
- Nutrition. Nutritional interventions are focussed on supplementation of nutrients to food/water. [REDACTED]
- [REDACTED]

The chemotherapeutic agent will be administered under general anaesthesia and the mice are followed during the development and recovery of mucositis. Throughout the whole experiment body weight, intake and the presence of diarrhoea are measured. Blood will be drawn to assess the plasma citrulline levels and faecal samples will be collected to investigate the gut microbiota during the experiment. Animals will be sacrificed on points of interest which depend on the aim of the experiment.

During some experiments animals might receive two cycles of chemotherapy to investigate the effect of successful interventions during a second cycle of chemotherapy. The effect of successful intervention during two cycles will be investigated since patients also receive multiple during the treatment of their tumour.

The night before the animals are sacrificed the animals are fasted since this is needed to perform a glucose absorption test to investigate the function of the intestine. For this test the animals receive a bolus of labelled glucose via oral gavage and the blood glucose levels will be monitored via repeated collection of blood via the tail vein.

---

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

Before each experiment a sample size calculation based on a power assessment with historical data from our laboratory (expected effect size and standard deviation of histology, blood citrulline levels, etc) will be performed to determine the group size of the animals. To reduce the amount of animals needed, the course of chemotherapy-induced mucositis will in general be monitored by blood citrulline levels, while histology is performed on a time point of interest.

## **B. The animals**

---

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

Both WT and transgenic male mice will be used in this mouse model of chemotherapy-induced mucositis. The strain and life stage of the mice will be determined during the development of the mice model. Male mice will be used to keep rat and mouse model as similar as possible. Since mucositis is a multifactorial in their development adding another variable (male vs female) into the equation would increase the variation too much. The mice will be purchased from commercial sources both from inside and outside of the EU. The life stage of the animals is post-weaning and young adults depending on the aim of the experiment.

---

The exact number of mice needed for each experiment will be calculated with a sample size calculation based on historical data from our laboratory and a

power assessment. Since the model still needs to be developed an estimation of the amount of mice needed in total is hard and this depends on the number of experiments needed to optimize the model. We estimate that in total 360 mice are needed, 120 of which for the development of the mice model.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: The goal of this project is to ameliorate the course of chemotherapy-induced mucositis. Mucositis is a multifactorial process which involves many different established contributors (intestinal epithelium, immune system and nutrition) which are hard to mimic in vitro. On top of that we will investigate the role of the intestinal microbiota. Therefore, an accurate in vitro model which combines all these factors is impossible to accomplish. The experiments are clearly too invasive to be able to investigate them in the human situation. Therefore, an animal model of chemotherapy-induced mucositis is needed. The availability of transgenic rats is very limited. To be able to investigate the involvement of specific genes in successful interventions a mice model would be necessary.

Reduction: Experiments during which animals are sacrificed at two or more time points compared to the control group(s) will, when the experimental aim allows this, not be measured on each time point since the control animals do not change during the experiment. Also parameters which do not require the animals to be sacrificed are assessed whenever appropriate, for example citrulline in blood samples and faeces samples.

Refinement: The model will be designed to minimize discomfort and stress for the animals. Anaesthesia and analgesia will be used whenever appropriate to minimize stress and discomfort.

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

The animals are handled often to minimize stress and discomfort during weighing or while being transferred. On top of that, animals are monitored frequently to identify potential discomfort as soon as possible. Anaesthesia and analgesia are given whenever needed. Potential environmental-polluting waste will be collected appropriately.

## 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.

Several possible interventions are investigated which could potentially ameliorate the course of severe mucositis. The role of microbiota during the development and recovery of chemotherapy-induced mucositis has not yet been extensively investigated. The research that has been done so far showed potential but due to flaws in the experimental design results are not solid enough to allow direct translation to humans. Some studies report nutritional interventions. However, these studies have so far focused on amino acid supplementation, other nutrients or combinations have hardly been studied.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III 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 will be housed individually. This is needed since group housing increases stress and in the model the increased stress leads to worsening of the symptoms. In turn this also leads to more variability between mice.

### 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 be anesthetized with Isoflurane/oxygen by or under supervision of experienced employees. Analgesia will be used if needed.

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

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

After administration of chemotherapeutic agent the mice will have several days of lowered intake, weight loss (<10%), diarrhoea and general sickness. We expect the adverse effects of WT mice welfare be similar to the adverse effects of the rat model. Genetic effects present in transgenic mice might possibly compromise welfare of the animals. However, these effects are impossible to describe now since missing gene will be determined based on results of experiments performed in this project. The mice used in this project will be already established transgenic mice strains. How these transgenic strains fare after the administration of chemotherapy could go both ways, depending on the missing gene and the mechanism we want to investigate. A gene maybe need to be inhibited/induced to improve the course of mucositis, a transgenic mice might genetically have an beneficial/worse outcome.

Explain why these effects may emerge.

The goal of our project is to change to course of chemotherapy-induced mucositis, the symptoms of mucositis are an impaired uptake of nutrients and a general sickness. Due to an impaired uptake of nutrients more water will be attracted to the faeces which results in diarrhoea. Combined the general sickness and diarrhoea lead to weight loss.

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

The interventions which are investigated are aimed to prevent occurrence or minimise severity of the mucositis. Also chemotherapy will be given at a dose which ensures the mucositis is self-limiting as it is in patients.

### **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.

When signs of severe complications, like severe weight loss (>15%) and general severe malaise (behavior, fur, hygiene) the mice will be sacrificed due to humane endpoints. After chemotherapy-injection the mice will be investigated daily.

Indicate the likely incidence.

<5% of the mice which receive chemotherapy

### **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').

Non-recovery: collection of organs after being sacrificed

Mild: individual housing, transport during experiments, oral gavage, collection of blood from tail vein, injection of intervention (IV,IP,SC), dexa-scan or nuclear magnetic resonance spectroscopy, faecal transfer, repeated collection of blood during glucose absorption test and fasting

Moderate: Administration of chemotherapy/NaCl via injection and experiencing mucositis.

The overall expected level of discomfort is moderate. The animals will be closely monitored after administration of chemotherapy until the end of 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.

To be able to investigate the histology of the intestine to evaluate the mucositis and its recovery and to collect the content of the gastrointestinal tract to evaluate the gut microbiota. Other organs are also investigated and harvested depending on the research question

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

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

Yes

# Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: (Interne RuG code **8024**)
2. Titel van het project: **To change the course of chemotherapy-induced mucositis.**
3. Titel van de NTS: **Het voorkomen of verminderen van ontsteking van de darmwand veroorzaakt door chemotherapie.**
4. Type aanvraag:
  - nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
  - naam: DEC-RUG
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] / [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: **11-08-2015**
  - aanvraag compleet: **11-08-2015**
  - in vergadering besproken: **20-08-2015, 15-10-2015**
  - anderszins behandeld: **16-10-2015, 02-11-2015, 10-11-2015, 18-11-2015**
  - termijnonderbreking(en) van / tot: **27-08-2015 tot 08-10-2015, 10-10-2015 tot 29-10-2015, 02-11-2015 tot 03-11-2015, 10-11-2015 tot 13-11-2015, 18-11-2015 tot 18-11-2015 (1 dag)**
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
  - aanpassing aanvraag: **08-10-2015, 29-10-2015**
  - advies aan CCD: **24-11-2015**
7. Eventueel horen van aanvrager **n.v.t.**

- Datum
- Plaats
- Aantal aanwezige DEC-leden
- Aanwezige (namens) aanvrager
- Strekking van de vraag / vragen
- Strekking van het (de) antwoord(en)
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag

8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **16-10-2015, 02-11-2015, 10-11-2015, 18-11-2015**

Strekking van de vraag / vragen

**Vragen t.a.v. Bijlage 1:**

U wilt in dit projectvoorstel gebruik maken van een gevalideerd mucositismodel bij de rat geïnduceerd door (éénmalige?) methotrexaat-toediening. Daarnaast noemt U nog "irinotecan or other chemotherapeutics" als optioneel voor modelinductie. Waar hangt de toepassing van farmaca anders dan methotrexaat van af of is dit van toepassing op een beoogd muismodel?

Kunt u specifieke go/no go-indicaties aangeven voor eventueel gebruik van irinotecan or other chemotherapeutics. Overweegt u, bij eventuele toepassing daarvan, hiervoor een nieuwe aanvraag in te dienen?

Volstaat éénmalige methotrexaat-toediening in principe ter inductie van mucositis?

U schrijft "During some experiments animals might receive multiple cycles of chemotherapy to investigate the effect of previous cycles on the outcome measures". Kunt U dit nader toelichten en aan hoeveel cycli wordt gedacht bij de rat? Kunt U ook het bijpassend (cumulatief) ongerief inschatten?

U geeft aan dat "whenever possible parameters which do not require the animals to be sacrificed are chosen." Aan welke uitleesparameters wordt gedacht met het oog op de statistische onderbouwing? Kennelijk verwacht U dat niet alle dieren geëuthanaseerd hoeven te worden, nietwaar?

**Vragen t.a.v. Bijlage 2:**

U schrijft "During some experiments animals might receive multiple cycles of chemotherapy to investigate the effect of previous cycles on the outcome measures". Kunt U dit nader toelichten en aan hoeveel cycli wordt gedacht bij de muis? Kunt U ook het bijpassend (cumulatief) ongerief inschatten?

U geeft aan dat "whenever possible parameters which do not require the animals to be sacrificed are chosen." Aan welke uitleesparameters wordt gedacht met het oog op de statistische onderbouwing? Kennelijk verwacht U dat niet alle dieren geëuthanaseerd hoeven te worden, nietwaar?

-

- Datum antwoord: **29-10-2015, 03-11-2015, 13-11-2015, 18-11-2015**



- Strekking van het (de) antwoord(en) **De gevraagde verduidelijkingen zijn verwerkt in het projectvoorstel en de bijlages. De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.**
9. Eventuele adviezen door experts (niet lid van de DEC) **n.v.t.**
- Aard expertise
  - Deskundigheid expert
  - Datum verzoek
  - Strekking van het verzoek
  - Datum expert advies
  - Expert advies

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet) **Ja.**
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag. **Ja.**
3. De DEC is competent om hierover te adviseren. **Ja.**
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering. **NVT.**

## **C. Beoordeling (inhoud):**

1. Het project is:
  - **uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord**
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en). **Ja.**
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als **reëel.**
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. **Ja.**
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën 11, 13 en 13c3 van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd.

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Herhaalde methotrexaat toediening nog onderbouwen.
7. Er zijn vooralsnog geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**.
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven daar het meten van citrulline in het bloed herhaalde meting aan hetzelfde dier mogelijk maakt. Het maximale aantal te gebruiken dieren lijkt realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij dit wettelijk vereiste onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.
9. 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 ondermeer gezien de toepassing van anesthesie bij methotrexaat gavage. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd. **Ja**.

## D. Ethische afweging

De DEC ziet dit project als een toetsbare eenheid. Het is een voorbeeld van een project dat in de concept CCD-notitie wordt beschreven onder voorbeeld 4: verschillende parallel uit te voeren deelprojecten die alle bijdragen aan het bereiken van het hoofddoel, in dit project het ontwikkelen van een (preventieve) therapie tegen mucositis. Dit is een frequent voorkomende complicatie, die bij ongeveer 55% van de kinderen, die chemotherapie ondergaan, optreedt en er is nog geen specifieke (preventieve) therapie tegen deze complicatie. Het onderhavige onderzoek heeft als doel de mogelijkheden van (preventieve) therapie van mucositis te vergroten en wel via drie pijlers, te weten de voeding, de samenstelling der darmwand en het 'microbioom' van de darm. De voor een ethische toetsing centrale vraag of dit directe doel en het hierboven genoemde uiteindelijk doel het uit te voeren onderzoek rechtvaardigen wordt door de DEC positief beantwoord. Hiertoe hanteren wij de volgende overwegingen:

De voorgestelde dierproeven dragen allen bij tot het bereiken van het hoofddoel van de aanvraag, namelijk te komen tot optimalisatie van de (preventieve) therapie van mucositis. Zoals betoogd vormt het geheel daarbij een goed toetsbare eenheid.

Per dierproef zijn de aantallen benodigde dieren inzichtelijk ingeschat met voldoende aandacht voor vermindering en verfijning. De onderzoeksgroep is bij uitstek gekwalificeerd voor het uitvoeren van dit onderzoek en beschikt over voldoende expertise om te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.

Ook het beschreven ongerief bij de voor het onderzoek te gebruiken ratten en muizen acht de DEC gerechtvaardigd gegeven de doeleinden van het project. Het is uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord en het is waarschijnlijk dat de doeleinden worden gehaald. Op termijn kan het project mogelijk voordelen opleveren voor een betere chemotherapeutische behandeling bij de mens en daarmee hopelijk soelaas bieden voor patiënten, die vooralsnog onbehandelbaar zijn voor mucositis als complicatie.

Op grond van alle voor de afweging relevante argumenten komt de DEC-RuG tot de conclusie dat dit onderzoek ethisch toelaatbaar en toetsbaar is, derhalve adviseert de DEC-RuG tot vergunningverlening.

## **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

**De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarde:**

**-Dat in onderhavige aanvraag alleen methotrexaat als mucositis inducerend chemotherapeuticum wordt gebruikt-**

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD105002015338

**Bijlagen**

2

Datum 1 december 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 27 november 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002015338. 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](http://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

### **Gegevens aanvrager**

#### Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500  
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 1179037  
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]  
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN  
IBAN: NL80ABNA0446049352  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

#### Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

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 december 2015  
Geplande einddatum: 1 december 2020  
Titel project: To change the course of chemotherapy-induced mucositis  
Titel niet-technische samenvatting: Het voorkomen of verminderen van ontsteking aan de darmwand veroorzaakt door chemotherapie  
Naam DEC: DEC-RUG  
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]  
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Er zijn geen bijlagen ontvangen.

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Groningen  
Datum: 25 november 2015



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,

9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD105002015338

**Bijlagen**

2

Datum 1 december 2015

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 1 december 2015

Vervaldatum: 31 december 2015

Factuurnummer: 15700338

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002015338	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** maandag 21 december 2015 10:43  
**Aan:** Info-zbo  
**CC:** Secretariaat DEC  
**Onderwerp:** RE: toelichting bij advies AVD105002015338 (RUG code 8024)  
**Bijlagen:** Vragen CCD naar DEC aanvraag [REDACTED] 181215.docx

**Categorieën:** Dossier: [REDACTED]

Beste [REDACTED]

Hierbij, voor zover mogelijk, antwoorden op uw vragen. Zie attachment.

Vr. gr.

[REDACTED] EC-RuG

---

**From:** Info-zbo [<mailto:info@zbo-ccd.nl>]  
**Sent:** donderdag 17 december 2015 15:24  
**To:** [REDACTED]  
**Subject:** toelichting bij advies AVD105002015338 (RUG code 8024)

Geachte leden van DEC Groningen,

De CCD heeft een aanvraag voor projectvergunning ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het betreft het project: "To change the course of chemotherapy-induced mucositis" met aanvraagnummer AVD105002015338, interne RUG code 8024. Wij willen u om toelichting vragen over enkele onduidelijkheden in de aanvraag en mogelijk is dit besproken in de vergadering van de DEC.

Bijlage 1: U heeft gesproken met de aanvrager over het gebruik van methodextraat en eventuele andere chemotherapeutica. In uw advies stelt u als voorwaarde enkel het gebruik van methodextraat als chemotherapeuticum voor deze projectaanvraag.

In de bijlage welke wij hebben ontvangen staan de overige farmaca of chemotherapeutica nog wel genoemd. Kunt u het antwoord van de onderzoeker op de betreffende vragen meer duiden? Is het mogelijk om het beschreven model op te zetten met alleen methodextraat? Geldt dit dan ook voor bijlage 2 waarin ditzelfde model opgezet wordt in muizen, of kan op basis van de uitkomsten in ratten, bijlage 1, er een noodzaak ontstaan andere chemotherapeutica in het muismodel te testen?

De aanvrager beschrijft dat de ratten individueel worden gehuisvest; "The animals will be housed individually. This is needed since group housing increases stress and in the model the increased stress leads to worsening of the symptoms. In turn this also leads to more variability between rats". De aanvrager voert als argument aan dat individueel huisvesten ook wenselijk is omdat de dieren een canule hebben en aan een swiffel systeem zijn gekoppeld.

Heeft de DEC dit besproken? Het individueel huisvesten is vanuit experimentele handelingen volledig te onderbouwen, maar kan bij ratten niet aangenomen worden dat het individueel huisvesten meer stress veroorzaakt dan groepshuisvesting en vanuit deze redentatie juist rekening gehouden moet worden met stress effecten op experimentele uitkomsten door het individueel huisvesten?

In bijlage 2 wordt voor mannelijke muizen dezelfde redentatie gevolgd, en deze zou voor het individueel huisvesten van mannelijke muizen wel meer navolgbaar zijn.

Heeft u in uw vergadering gesproken over de tijdsplanning van de uitvoer van bijlage 2, het muis model? De aanvrager geeft aan dat dit afhankelijk is van uitkomsten uit bijlage 1. Vind u dat hier duidelijke keuzemomenten gedefinieerd moeten zijn?

Wij willen aan de aanvrager nog de volgende vragen voorleggen:  
In bijlage 1 en 2 wordt bij het cumulatief ongerief gerefereerd aan DEXA of MRI scans. Dit is niet beschreven in de tekst van de bijlagen, dit moet nader beschreven worden.

In bijlage 1 beschrijft u het gebruik van antibiotica, naast pre/pro- en synbiotica. In bijlage 2 beschrijft u alleen het gebruik van pre/pro- en synbiotica, is dit een bewuste keuze of een tekstuele verschrijving?

In afwachting van uw antwoord met vriendelijke groet,



**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

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

---

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

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

Bijlage 1: U heeft gesproken met de aanvrager over het gebruik van methodextraat en eventuele andere chemotherapeutica. In uw advies stelt u als voorwaarde enkel het gebruik van methodextraat als chemotherapeuticum voor deze projectaanvraag.

In de bijlage welke wij hebben ontvangen staan de overige farmaca of chemotherapeutica nog wel genoemd. Kunt u het antwoord van de onderzoeker op de betreffende vragen meer duiden?

De overige farmaca/chemotherapeutica staan er nog ten onrechte. U zou de aanvrager kunnen vragen dit te verwijderen.

De vraag die door de DEC gesteld is (staat tevens in adviesformulier): 'Kunt u specifieke go/no go-indicaties aangeven voor eventueel gebruik van irinotecan or other chemotherapeutics. Overweegt u, bij eventuele toepassing daarvan, hiervoor een nieuwe aanvraag in te dienen?'

**Antwoord onderzoeker:** 'Irinotecan en andere chemotherapeutica willen we gaan gebruiken in het model wanneer er succesvolle interventies zijn gevonden bij MTX. Het klopt inderdaad dat het werkingsmechanisme van de chemotherapeutica anders is, maar het ziektebeeld, de mucositis, is vergelijkbaar tussen de verschillende chemotherapeutica. Het doel van de chemotherapeutica is om de celdeling te stoppen en dit doen ze op een verschillende manier, de uitkomst is alleen wel vergelijkbaar. Interventies die we vinden bij MTX werken mogelijk ook bij andere chemotherapeutica, alleen dit zal eerst onderzocht moeten worden. Het doel van dit project is om het verloop van chemotherapie-geïnduceerde mucositis te veranderen, volgens ons past het onderzoeken van de effectiviteit van succesvolle interventies bij een ander chemotherapeuticum binnen dit doel'

Naar oordeel van de DEC is onderzoek met een ander chemotherapeuticum met een ander werkingsmechanisme, zoals irinotecan, een afwijkend onderzoeksdoel welke beter ook omschreven zou moeten worden. Er zijn ook geen go/no go criteria voor aangegeven. In tegenstelling tot methotrexaat, is mucositis-inductie middels irinotecan een nog niet voldoende ontwikkeld model. Bij toepassing hiervan zou een nieuwe aanvraag passen

Is het mogelijk om het beschreven model op te zetten met alleen methodextraat?

Ja, middels een ruim aantal referenties genoemd in de aanvraag blijkt dit. Het is een gevalideerd model en wordt ook als zodanig door aanvrager benoemd. De DEC is bekend met het eerdere (methotrexaat-geïnduceerde) mucositis werk van de aanvrager en heeft in het advies benoemd dat de onderzoeksgroep bij uitstek gekwalificeerd is voor het type werk.

Geldt dit dan ook voor bijlage 2 waarin ditzelfde model opgezet wordt in muizen

Ja

, of kan op basis van de uitkomsten in ratten, bijlage 1, er een noodzaak ontstaan andere chemotherapeutica in het muismodel te testen?

Dat kan niet. De onderzoeksvraag in deze aanvraag is of de interventie (bestaande uit een aantal verschillende invalshoeken), (effecten van) mucositis kan verminderen. Het methotrexaat model is gevalideerd en is de basis voor het testen van de interventie.

Hieruit zal geen 'noodzaak voor het testen van andere chemotherapeutica in muizen kunnen ontstaan'.

De aanvrager beschrijft dat de ratten individueel worden gehuisvest; "The animals will be housed individually. This is needed since group housing increases stress and in the model the increased stress leads to worsening of the symptoms. In turn this also leads to more variability between rats". De aanvrager voert als argument aan dat individueel huisvesten ook wenselijk is omdat de dieren een canule hebben en aan een swiffel systeem zijn gekoppeld.

Heeft de DEC dit besproken? Het individueel huisvesten is vanuit experimentele handelingen volledig te onderbouwen, maar kan bij ratten niet aangenomen worden dat het individueel huisvesten meer stress veroorzaakt dan groepshuisvesting en vanuit deze redenering juist rekening gehouden moet worden met stress effecten op experimentele uitkomsten door het individueel huisvesten?

In bijlage 2 wordt voor mannelijke muizen dezelfde redenering gevolgd, en deze zou voor het individueel huisvesten van mannelijke muizen wel meer navolgbaar zijn.

Dit is niet door de DEC besproken. De aanvrager meldt dat stress een factor is waar rekening mee wordt gehouden t.a.v. de gegeven dosis methotrexaat in ratten.

Heeft u in uw vergadering gesproken over de tijdsplanning van de uitvoer van bijlage 2, het muis model? De aanvrager geeft aan dat dit afhankelijk is van uitkomsten uit bijlage 1. Vind u dat hier duidelijke keuzemomenten gedefinieerd moeten zijn?

Er is niet gesproken over tijdsplanning van de uitvoer van bijlage 2. Uw vraag over de keuzemomenten vraagt naar een nieuwe vorming van mening van de DEC t.a.v. dit punt. Die is op deze korte termijn (een aantal dagen responsie tijd) niet te bepalen aangezien er geen vergadering is.

Wij willen aan de aanvrager nog de volgende vragen voorleggen:

In bijlage 1 en 2 wordt bij het cumulatief ongerief gerefereerd aan DEXA of MRI scans. Dit is niet beschreven in de tekst van de bijlagen, dit moet nader beschreven worden.

In bijlage 1 beschrijft u het gebruik van antibiotica, naast pre/pro- en synbiotica. In bijlage 2 beschrijft u alleen het gebruik van pre/pro- en synbiotica, is dit een bewuste keuze of een tekstuele verschrijving?

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** dinsdag 22 december 2015 10:08  
**Aan:** Info-zbo  
**Onderwerp:** RE: Dossier AVD105002015338  
**Bijlagen:** 8024-1 [REDACTED] NTS (1).docx; 20151221 Bijlage 1 projectvoorstel mucositis.docx; 20151221 Bijlage 2 projectvoorstel mucositis.docx; 20151221 Projectvoorstel mucositis (1).docx; Aanvraag project mucositis (1).docx

**Categorieën:** Dossier [REDACTED]

Geachte mevrouw [REDACTED]

Naar aanleiding van de vragen van de CCD hebben wij een aantal aanpassingen gedaan in de tekst. Hieronder de reactie op elk van de vragen.

**In bijlage dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 refereert u bij het cumulatief ongerief aan DEXA of MRI scan. Deze handeling wordt niet verder uitgewerkt in de tekst.**

In bijlage 3.4.4.1 en 3.4.4.2 (2.A.1) is de tekst aangepast zodat de handelingen uitgewerkt worden.

“With a DEXA-scan or nuclear magnetic resonance spectroscopy we can measure the composition of the body, this shows in which compartment the animals lose weight (fat tissue, muscle or combination). Feeding strategies could be designed to target the loss of weight in a certain compartment and try to prevent it.”

**In bijlage 3.4.4.1 beschrijft u het gebruik van antibiotica, naast pre/pro- en synbiotica. In bijlage 3.4.4.2 beschrijft u alleen het gebruik van pre/pro- en synbiotica, is dit een bewuste keuze of een tekstuele verschrijving?**

Dit was een tekstuele verschrijving en is aangepast zodat bij beide antibiotica staat.

**U beschrijft dat de uitvoer en keuzes die gemaakt worden voor het uitvoeren/ opzetten van dit model in de muis (bijlage 3.4.4.2), mogelijk afhankelijk zijn van uitkomsten uit bijlage 3.4.4.1. Kunt u de keuzemomenten en eventuele go/no go momenten en de tijdsplanning van bijlage 3.4.4.1 ten opzichte van bijlage 3.4.4.2 meer uitwerken in de tekst?**

Om het verloop en go/no go momenten te verduidelijken in de tekst is de tekst in het projectvoorstel aangepast bij onderdeel 3.4.2 (de laatste paragraaf)

“The chemotherapy-induced mucositis mouse model will assess mechanisms of successful strategies which require knock-outs or other tests currently unavailable in rats. The mouse-model will be developed independent of the results of earlier studies, in year two of the project. Once established, it will only be used to study interventions which seem successful in the rat model, but which need knock-outs or other tests currently unavailable in rats. “

**De DEC heeft als voorwaarde gesteld dat dit project alleen met methotrexaat wordt uitgevoerd, en hier ook met u over gecorrespondeerd. Zou u uit de tekst van de bijlagen de andere farmaca en chemotherapeutica kunnen verwijderen om onduidelijkheid te voorkomen?**

Dit is aangepast in de tekst zoals u voorstelt.

**In bijlage 3.4.4.1 beschrijft u het individueel huisvesten van ratten. De keuze voor individueel huisvesten van de dieren is vanuit de experimentele opzet en –handelingen te rechtvaardigen, maar uw redentatie**

**dat ratten bij individuele huisvesting minder stress ervaren dan bij groepshuisvesting is niet algemeen geaccepteerd. Kunt u deze tekst heroverwegen.**

We hebben de tekst aangepast en het statement over individueel huisvesten en stress eruit gehaald om verwarring te voorkomen.

Hopelijk hebben wij de verschillende vragen van de CCD kunnen oplossen. Mochten er nog aanvullende vragen zijn horen wij het graag.

Met vriendelijke groet,

---

**Van:** Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]

**Verzonden:** maandag 21 december 2015 11:34

**Aan:** [REDACTED]

**CC:** [REDACTED]

**Onderwerp:** Dossier AVD105002015338

Geachte [REDACTED],

U heeft een aanvraag tot projectvergunning gedaan bij de CCD. het betreft dossier AVD105002015338 getiteld: 'To change the course of chemotherapy-induced mucositis'. In uw aanvraag zitten nog een aantal onduidelijkheden. Wij hebben ook aan de DEC om nadere toelichting gevraagd.

Het antwoord op de vragen zal naar onze mening leiden tot tekstuele aanpassing van de bijlagen 3.4.4.1 en 3.4.4.2

In bijlage dierproeven 3.4.4.1 en 3.4.4.2 refereert u bij het cumulatief ongerief aan DEXA of MRI scan. Deze handeling wordt niet verder uitgewerkt in de tekst.

In bijlage 3.4.4.1 beschrijft u het gebruik van antibiotica, naast pre/pro- en synbiotica. In bijlage 3.4.4.2 beschrijft u alleen het gebruik van pre/pro- en synbiotica, is dit een bewuste keuze of een tekstuele verschrijving?

U beschrijft dat de uitvoer en keuzes die gemaakt worden voor het uitvoeren/ opzetten van dit model in de muis (bijlage 3.4.4.2), mogelijk afhankelijk zijn van uitkomsten uit bijlage 3.4.4.1 Kunt u de keuzemomenten en eventuele go/no go momenten en de tijdsplanning van bijlage 3.4.4.1 ten opzichte van bijlage 3.4.4.2 meer uitwerken in de tekst?

De DEC heeft als voorwaarde gesteld dat dit project alleen met methotrexaat wordt uitgevoerd, en hier ook met u over gecorrespondeerd. Zou u uit de tekst van de bijlagen de andere farmaca en chemotherapeutica kunnen verwijderen om onduidelijkheid te voorkomen?

In bijlage 3.4.4.1 beschrijft u het individueel huisvesten van ratten. De keuze voor individueel huisvesten van de dieren is vanuit de experimentele opzet en –handelingen te rechtvaardigen, maar uw redenering dat ratten bij individuele huisvesting minder stress ervaren dan bij groepshuisvesting is niet algemeen geaccepteerd. Kunt u deze tekst heroverwegen.

In verband met de planning en de behandeling in de CCD vergadering zou het prettig zijn als u de antwoorden/ aangepaste bijlagen woensdag 23 december 2015 aan ons verstuurd worden,

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)



.....  
T: 0900 2800028

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

---

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

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



## 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.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)).
- Or contact us by phone (0900-2800028).

### 1 General information

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

### 2 Categories

- 2.1 Please tick each of the following boxes that applies to your project.
- Basic research
- Translational or applied research
- Regulatory use or routine production
- Research into environmental protection in the interest of human or animal health or welfare
- 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.
- 

Survival of children with cancer has increased significantly over the last decades, due to more intensive treatment protocols. The disadvantage of these more intensive chemotherapy treatment protocols is a higher frequency of side effects. One of these side effects is gastrointestinal mucositis (hereafter mucositis); a complex inflammatory reaction of the mucous membranes of the alimentary tract. Mucositis develops via different biological stages resulting in villus atrophy, ulceration and loss of barrier function, ending with spontaneous healing. The patients suffer from vomiting, abdominal pain, diarrhea, weight loss and are at increased risk of developing a bacteremia or sepsis. Mucositis leads to a lower quality of life and an increased morbidity and mortality. So far no interventions are found which prevents or to treat GI mucositis.

In this project we aim to change to course of chemotherapy-induced mucositis. To be able to achieve the aim, both fundamental and translational research is required.

Mucositis is a complex multifactorial process with many different established contributors (intestinal epithelium, immune system and nutrition). Based on these contributors a 5-phase model was developed for the pathobiology of oral mucositis.<sup>1</sup> This model is also the basis for the pathobiology of gastrointestinal mucositis. However, as one can imagine the environment in the intestine is markedly different from the oral environment, and thus the pathophysiology of gastrointestinal mucositis is probably (slightly) different. In short, the 5-phase model describes an initiation phase during which nuclear factor kappa B (NFκB) is activated by the formation of reactive oxygen species (ROS) and the occurrence of damage to the DNA. This is followed by the primary damage response phase during which messenger molecules / cytokines (among others: tumour necrosis factor α (TNFα)) are induced which lead to tissue inflammation and apoptosis. In the amplification phase the messenger molecules / cytokines are amplified due to positive feedback loops leading to increased inflammation and apoptosis. During the ulcerative phase the epithelial barrier integrity is lost due to the apoptosis and intestinal damage, which is spontaneously healed during the healing phase. However, in the gut there are other possible contributors which need to be explored for example the gut microbiota.<sup>2,3</sup> These microbiota have been reported to play a role in gastrointestinal mucositis in several studies so far.

In this project we will do fundamental research into a possible contributor which is not included in the 5-phase model, the gut microbiota.<sup>2</sup> The gut is in a continuous state of low grade infection due to the interactions between the gut microbiota and the immune system. Previous research has shown there is a change in microbial composition of the microbiota after chemotherapy, coinciding with gastrointestinal mucositis.<sup>3</sup> These changes in the microbiota potentially influence the inflammatory reaction seen during mucositis, since a change in composition of the gut microbiota would also alter the balance in the continuous state of low grade infection in the intestine. Interventions aimed to influence the composition of the gut microbiota could positively influence the course of mucositis by promoting a healthy composition of the microbiota, which could restore the normal state of low-grade inflammation in the intestine.

---

The second component we want to investigate in this project are interventions aimed to influence the inflammatory response and/or improve the intestinal barrier. The 5-phase model is mainly revolved around the inflammatory reaction present during mucositis. Drugs which influence this inflammatory reaction can potentially influence the course of gastrointestinal mucositis by reducing the damage done by the inflammation. An integral part of the damage done during mucositis is the ulceration phase, during which the patient suffers from the loss of the barrier function. Therapies which improve the barrier function by for example promoting proliferation, reducing apoptosis, improving cell junctions and/or preventing cellular changes, could reduce or prevent the damage to the intestinal barrier which is the main problem for the patient.

The last component we will investigate are nutritional based interventions. In previous research performed by our group the absorption of different components of the nutrition during mucositis were investigated.<sup>4</sup> Nutrition is known to be able to influence the barrier function of the intestine during mucositis and other intestinal complications. In this study we will continue investigations into potential nutritional interventions which improve the barrier function and could help speed up the recovery after the ulceration phase.

A strength of this study is the potential of the different components of the study to influence each other. The nutrition is for example known to influence the composition of the microbiota, which could lead to double beneficial effects.

The model we developed and will use in this project is well validated and suitable to test interventions based on the results of our basic research. Therefore, during this project translational research will be performed to study whether we can change the course of chemotherapy-induced mucositis.

- (1) [REDACTED]
- (2) [REDACTED]
- (3) [REDACTED]
- (4) [REDACTED]

---

### 3.2 Purpose

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

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

The main objective of this project is to find prevention or treatment strategies which change the course of severe mucositis. To achieve this objective several potential strategies will be investigated namely, the gut microbiota, therapies/prophylaxis and nutrition. Also the mechanism behind the interventions will be investigated.

We deem the aim of this project feasible within the duration of this project. In previous projects the chemotherapy-induced mucositis rat model which we will use in this project was developed. The model is now well validated and there is a tremendous amount of experience with the model.<sup>1-4</sup> The project consists of different research avenues which will be investigated simultaneously with good communication between the different contributors. The combination of the different areas of research and combination of knowledge gained within each area will help us achieve the aim of the project.

---

### 3.3 Relevance

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

Previous research has shown that 55% of the children receiving chemotherapy develop intestinal mucositis. On top of that when patients were asked the most debilitating side-effect of chemotherapy, symptoms of mucositis were mentioned the most. The overall consequences of the mucositis not only involves quality of life after chemotherapy courses, but probably also decreases survival due to treatment reduction, treatment delay, decreased nutritional state, which on its own is associated with treatment complications and increased mortality. Up until now there are no interventions in place which prevent or improve the course of mucositis, which we want to change with this project.

(1) [REDACTED]

(2) [REDACTED]

(3) [REDACTED]

(4) [REDACTED]

### 3.4 Research strategy

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

This projects aims to change the course of chemotherapy-induced mucositis and their mechanism of action. Different potential prevention or treatment strategies will be assessed in a chemotherapy-induced mucositis rat model.

The first strategy is to investigate the relevance of intervening at the level of the gut microbiota. The pathophysiology of the possible relationship between the GI microbiota and mucositis has been extensively reviewed in a paper of our research group. However, little research to investigate the relationship has been done until this point. We investigated the microbiota of pediatric acute myeloid leukemia (AML) patients, which demonstrated a significant decrease in the total number and a change in composition of the fecal bacteria. This result was replicated in a rat model of chemotherapy-induced mucositis by our group and by others. The relationship between the microbiota and the development and recovery of mucositis and possible interventions is the first possible strategy investigated here. Possible interventions for the microbiota are among others antibiotics to limited potential pathogenic bacteria, pro- and prebiotics to promote a 'healthy' population of the microbiota or a combination of the different interventions.

Secondly, interventions aimed to influence the inflammatory response and/or improve the intestinal barrier will be investigated. Previous research has shown the beneficial effects of inhibition of several cytokines (among others [REDACTED])<sup>1</sup> Here, we will continue to investigate drugs which influence the inflammatory response during mucositis and further elucidate important components of the inflammatory response during mucositis. [REDACTED]

[REDACTED]<sup>2</sup> Another important feature in the previously mentioned 5-phase model is the disruption of the intestinal barrier during the ulceration phase. Interventions aimed to improve the intestinal barrier will be investigated in this study. One approach to improve the barrier function is to limit cell death, this can be accomplished to reduce apoptosis or via increased proliferation of the intestinal epithelial cells. Another approach is to improve the barrier function by interventions aimed at the cellular junctions. Increasing the amount or strength of the cellular junctions (for example tight junctions) between the epithelial cells, the disruption of the intestinal barrier might be prevented or limited. [REDACTED]

[REDACTED]<sup>3</sup>

A third possible strategy are interventions based on the nutrition. Previous research in our group has focused on feeding strategies based on parental nutrition or tube feeding strategies and the uptake of nutrients. In this study we will continue investigating optimal feeding strategies, on top of that we will also investigate nutritional interventions focused on supplementation of the intake. [REDACTED]

The three previously mentioned strategies are closely related, as the interventions investigated could also have an effect on other components. Nutrition is known to influence the microbiota composition in the gut and there is a link between the microbiota and the inflammatory response present, as the intestine is in a constant state of low grade inflammation due to interactions between microbiota and immune system. Therefore, combinations of effective interventions could be investigated to show whether the combination has an additive or synergistic effect on the course of severe mucositis.

To investigate the mechanism behind successful strategies we would like to have knock-outs available. The availability of knock-out rats is far from complete compared to mice. Therefore, we would like to transpose our chemotherapy-induced mucositis rat model into a mouse model to be able to investigate proposed mechanisms for the interventions. As described above, the interaction between the gut microbiota and the immune system is important for the development of mucositis. Therefore, we will study knock out models of genes encoding for receptors which are important for the interaction of this interaction ([REDACTED]). On the other hand the inflammatory response could be hypothesized to be the major contributor to the development of mucositis and a knock-out of a central gene ([REDACTED]) could reduce the severity of the mucositis. More genes of interest will be decided during the course of the study, depending on new literature and results of above mentioned studies.

The three different research strategies will all be started simultaneously and continue over the course of the entire project. The exact planning of these experiments is hard to predict since the outcomes of earlier experiments taken into account in the development and planning of new experiments. The development of the mouse model will most likely start in year two.

- (1) [REDACTED]
- (2) [REDACTED]
- (3) [REDACTED]

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

The different components of the project will all employ the rat model of chemotherapy-induced mucositis which is a well validated model that has been developed and further employed in previous projects.<sup>1-4</sup> The last part of the project which tries to elucidate the mechanisms of different interventions will be performed in both our established rat model and a mouse model which is to be developed. The mouse model will be developed to have knock-outs available since in rats the knock-outs are limited.

For the first component of the study the chemotherapy-induced rat model of mucositis will be employed during which the relationship between the mucositis and the gut microbiota will be elucidated. To investigate this relationship different experiments will be performed during which (part of) the microbiota is depleted using antibiotics, bacterial strains will be added using probiotics, prebiotics will be given to modulated the composition of the gut microbiota or the effect of the gut microbiota will be mimicked.

The second component aims to prevent or elevate the mucositis by improving of cell survival, limiting inflammation or via other mechanisms. During these experiments the animals will be (prophylactically) treated with drugs which for example could improve cell survival, promote cell proliferations, limit apoptosis or limit inflammation.

The third component aims to intervene in the nutrition.

The chemotherapy-induced mucositis mouse model will assess mechanisms of successful strategies which require knock-outs or other tests currently unavailable in rats. The mouse-model will be developed independent of the results of earlier studies, in year two of the project. Once established, it will only be used to study interventions which seem successful in the rat model, but which need knock-outs or other tests currently unavailable in rats.

(1)

(2)

(3)

(4)

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 components all have the goal to change the course of severe mucositis and the interventions are designed to target different factors which could influence the course of mucositis. However, the influence of each of the component is not limited to the component itself. Changes in nutrition also have an influence on the composition of the microbiota and could possibly also improve cell survival. The composition of the microbiota is also known to influence the inflammation in the intestine. Therefore, the different components of the project are closely linked together.

Interventions which improve the course of chemotherapy-induced mucositis will be selected and interventions combined if possible to investigate possible synergistic effects.

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	Chemotherapy-induced mucositis rat model
2	Chemotherapy-induced mucositis mouse model
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.zbo-ccd.nl](http://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'.	10500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Rijksuniversiteit Groningen	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	Chemotherapy-induced mucositis rat 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.

To assess the course of chemotherapy-induced mucositis a rat model was developed previously in our department.<sup>1</sup> To be able to investigate the chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis (hereafter mucositis) the rats in our model receive an injection of methotrexate (MTX) after which the mucositis can be investigated. During a bout of mucositis the rats will develop diarrhoea, reduce their food intake and as such reduce in body weight. These parameters will be measured throughout the whole experiment. With a DEXA-scan or nuclear magnetic resonance spectroscopy we can measure the

composition of the body, this shows in which compartment the animals lose weight (fat tissue, muscle or combination). Feeding strategies could be designed to target the loss of weight in a certain compartment and try to prevent it.

When we study different feeding strategies currently used in patients (parental feeding and tube feeding) a rat model with a catheter into the vena jugularis or the duodenum was developed. These rats will receive surgery during which they received a permanent catheter in the duodenum or vena jugularis which will be subcutaneously tunnelled to the head, where attachment to the swivel system is possible. The swivel system is used to continuously infuse parenteral or tube feeding. After the operation which places the catheter the rats receive analgesics for 24 hours and are enabled to recover for seven days. The dose of the MTX in this model is lowered since the animals are under increased stress due to the catheter.

Primary outcome measures:

- Histology of the intestine: To determine the severity of mucositis, the histology of the intestine will be investigated. The histology will be measured on time points of interest when animals are sacrificed.
- Blood citrulline levels: To reduce the amount of animals needed the blood levels of citrulline and/or other (blood) markers will be measured during the experiment. Citrulline is an amino-acid almost exclusively produced by enterocytes, the blood levels of citrulline are a marker for the enterocyte mass in the intestine.
- Gut microbiota: To investigate the gut microbiota, intestinal content will be collected in which the microbiota will be measured. However, this is only possible after animals are sacrificed. Therefore, faeces will be collected to investigate the gut microbiota during the experiment.
- Glucose absorption: Before the rats will be sacrificed they will be fasted overnight and a glucose absorption test will be performed, this test is performed to test the intestinal function.

(1) [REDACTED]

---

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

In general the previously mentioned MTX-induced rat model will be employed to investigate the effect of different interventions before and/or after administration of the chemotherapeutic agent.

Intervention studies will be carried out with:

- Anti-, Pro-, pre- or synbiotics. These are interventions aimed to enlarge the bacterial population of the microbiota and/or to change its composition. Antibiotics will be aimed to reduce the populations of potentially pathogenic bacteria, these can be given in the food/drinking water or via oral gavage. Probiotics are one or more bacterial strains which are given via oral gavage, prebiotics are substances ([REDACTED]) which can be given in the food/drinking water or via oral gavage and synbiotics are a combinations of the two. Depending on the aim of the experiment these will be given once or multiple times during the experiment.
- Drugs aimed to influence the inflammatory response. These drugs will most likely be given via an (intravenous, intraperitoneal or subcutaneous) injection, depending on the optimal route of the intervention, as a prophylaxis or therapy. With these studies we aim to influence the inflammatory response in a beneficial way to limit the damage done during mucositis or to fasten the recovery ([REDACTED]).
- Drugs targeting the intestinal barrier. Drugs improving the intestinal barrier will also most likely be given via an injection, although certain drugs could potentially be given via oral gavage or in the food/drinking water, given as prophylaxis or therapy. These drugs aim to prevent or limit the disruption of the intestinal barrier during the ulceration phase of mucositis [REDACTED]



- Nutrition. Nutritional interventions include both feeding strategies and supplementation to food/water.

MTX will be administered under general anaesthesia and the rats are followed during the development and recovery of mucositis. Throughout the whole experiment body weight, intake and the presence of diarrhoea are measured. During the experiment blood samples will be taken daily or every other day to measure blood levels of citrulline and/or other biomarkers. Faecal samples will be collected to investigate the gut microbiota during the experiment. Animals will be sacrificed on points of interest which depend on the aim of the experiment.

During some experiments animals might receive two cycles of chemotherapy to investigate the effect of successful interventions during a second cycle of chemotherapy. The effect of successful intervention during two cycles will be investigated since patients also receive multiple during the treatment of their tumour.

The night before the animals are sacrificed the animals are fasted since this is needed to perform a glucose absorption test to investigate the function of the intestine. For this test the animals receive a bolus of labelled glucose via oral gavage and the blood glucose levels will be monitored via repeated collection of blood via the tail vein.

---

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

Before each experiment a sample size calculation based on a power assessment with historical data from our laboratory (expected effect size and standard deviation of histology, blood citrulline levels, etc) will be performed to determine the group size of the animals. To reduce the amount of animals needed, the course of chemotherapy-induced mucositis will in general be monitored by blood citrulline levels, while histology is performed on a time point of interest.

---

## **B. The animals**

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

We chose wild-type Wistar male rats as animal model in this project since in preceding projects a chemotherapy-induced rat model was developed. This is a validated model and the model is very suitable for the experiments planned in the present project. The model is optimized for male rats during the development of the model, which means the dose in this model is most likely not optimized for female rats. On top of that, the fact that mucositis is a multifactorial in their development adding another variable (male vs female) into the equation would increase the variation too much.

The rats in our experiments will be purchased from commercial sources both from inside and outside of the EU. The life stage of the animals is post-weaning and young adults depending on the aim of the experiment. We estimate that approximately 8 rats are required for each experimental group in which mucositis is induced. The exact number of rats needed for each experiment will be calculated with a sample size calculation based on historical data from our laboratory and a power assessment. With these group sizes, the estimation that each experiment has 3 groups with 2 time points and the estimation of 3 experiments each year of the five years of this project leads to an estimated number of 720 animals needed.

---

## **C. Re-use**

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

#### **D. Replacement, reduction, refinement**

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

Replacement: The goal of this project is to ameliorate the course of chemotherapy-induced mucositis. Mucositis is a multifactorial process which involves many different established contributors (intestinal epithelium, immune system and nutrition) which are hard to mimic in vitro. On top of that we will investigate the role of the intestinal microbiota. Therefore, an accurate in vitro model which combines all these factors is impossible to accomplish. The experiments are clearly too invasive to be able to investigate them in the human situation. Therefore, an animal model of chemotherapy -induced mucositis is needed.

Reduction: Experiments during which animals are sacrificed at two or more time points compared to the control group(s) will, when the experimental aim allows this, not be measured on each time point since the control animals do not change during the experiment. Also parameters which do not require the animals to be sacrificed are assessed whenever appropriate, for example citrulline in blood samples and faeces samples.

Refinement: The animal model employed in this project is a well validated model in which the development and recovery of mucositis can both be studied. Anaesthesia and analgesia will be used whenever appropriate to minimize stress and discomfort.

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

The animals are handled often to minimize stress and discomfort during weighing or while being transferred. On top of that, animals are monitored frequently to identify potential discomfort as soon as possible. Anaesthesia and analgesia are given whenever needed. Potential environmental-polluting waste will be collected appropriately.

### **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.

Several possible interventions are investigated which could potentially ameliorate the course of severe mucositis. The role of microbiota during the development and recovery of chemotherapy-induced mucositis has not yet been extensively investigated. The research that has been done so far showed potential but due to flaws in the experimental design results are not solid enough to allow direct translation to humans. Some studies report nutritional

interventions. However, these studies have so far focused on amino acid supplementation, other nutrients or combinations have hardly been studied.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III 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 will be housed individually. This is needed since we want to measure food intake, water intake and some experiments require supplementation to the water/food (for example antibiotics). Also the catheterized animals require individual housing due to the connection to a swivelsystem.

### 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 rats will be anesthetized with Isoflurane/oxygen by or under supervision of experienced employees. Analgesia will be used after the catheterization and whenever needed at other moments.

### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

After administration of the chemotherapeutic agent the rats will have 4 days of lowered food intake, weight loss (<10%), diarrhoea and general sickness. Also in the catheter model there is increased stress on the animals, which potentiates effects of mucositis. Therefore, the dose of chemotherapeutics is lowered in this model.

Explain why these effects may emerge.

The goal of our project is to change the course of chemotherapy-induced mucositis, the symptoms of mucositis are an impaired uptake of nutrients and a general sickness. Due to an impaired uptake of nutrients more water will be attracted to the faeces which results in diarrhoea. Combined the general sickness and diarrhoea lead to weight loss.

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

Chemotherapy will be given at a dose which ensures the mucositis is self-limiting as it is in patients. This dose is optimized to minimize severity and suitable to investigate mucositis. The interventions which are investigated are aimed to prevent occurrence or minimise severity of the mucositis.

#### **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.

When signs of severe complications, like severe weight loss (>15%) and general severe malaise (behavior, fur, hygiene) the rats will be sacrificed due to humane endpoints. After injection with the chemotherapeutic agent the rats will be investigated daily.

Indicate the likely incidence.

<5% of the animals receiving chemotherapy.

#### **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').

Non-recovery: collection of organs after being sacrificed

Mild: individual housing, transport during experiments, oral gavage, collection of blood from tail vein, injection of intervention (IV,IP,SC), dexamethasone or nuclear magnetic resonance spectroscopy, faecal transfer, repeated collection of blood during glucose absorption test, fasting and continuous infusion of parenteral or tube feeding.

Moderate: Administration of chemotherapy/NaCl via injection, experiencing mucositis and placement of permanent catheter into the vena jugularis or duodenum.

The overall expected level of discomfort is moderate. The animals will be closely monitored after administration of chemotherapy until the end of 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.

To be able to investigate the histology of the intestine to evaluate the mucositis and its recovery and to collect the content of the gastrointestinal tract to evaluate the gut microbiota. Other organs are also investigated and harvested depending on the research question.

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](http://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'.	10500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Rijksuniversiteit Groningen	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	2	Chemotherapy-induced mucositis mouse 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.

Since the aim with the mouse model is to replicate the results from the rat model to have knock-outs available, the mouse model will be designed to be as similar as possible to the rat model as possible given the differences between the two species. Therefore, there will be overlap between the outcome measures and interventions possibly performed in both models.

The main reason to develop a methotrexate (MTX)-induced mucositis mouse model is the availability of transgenic mouse models enabling mechanistic studies of causes of mucositis. The mouse model will be developed based on available literature combined with experience we have with the rat model. Based on literature a suitable mouse strain will be selected and an approximate chemotherapy dose will be determined to be given IV and in a single dose. The dose will be optimised in several experiments to ensure minimal severity for the mouse, combined with a suitable model to investigate mucositis.

To be able to investigate the MTX-induced gastrointestinal mucositis (hereafter mucositis) the mice in our model will receive an injection of MTX after which the mucositis can be investigated. During a bout of mucositis the mice will develop diarrhoea, reduce their food intake and as such reduce in body weight. These parameters will be measured throughout the experiments. With a DEXA-scan or nuclear magnetic resonance spectroscopy we can measure the composition of the body, this shows in which compartment the animals lose weight (fat tissue, muscle or combination). Feeding strategies could be designed to target the loss of weight in a certain compartment and try to prevent it.

Primary outcome measures:

- Histology of the intestine: To determine the severity of mucositis, the histology of the intestine will be investigated. The histology will be measured on time points of interest when animals are sacrificed.
- Blood citrulline levels: To reduce the amount of animals needed the blood levels of citrulline and/or other (blood) markers will be measured during the experiment. Citrulline is an amino-acid almost exclusively produced by enterocytes, the blood levels of citrulline are a marker for the enterocyte mass in the intestine.
- Gut microbiota: To investigate the gut microbiota, intestinal content will be collected in which the microbiota will be measured. However, this is only possible after animals are sacrificed. Therefore, faeces will be collected to investigate the gut microbiota during the experiment.
- Glucose absorption: Before the rats will be sacrificed they will be fasted overnight and a glucose absorption test will be performed, this test is performed to test the intestinal function.

---

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

When the mice model is successfully developed and optimized, the model will be used to investigate the effect of different interventions before and/or after administration of the chemotherapeutic agent.

The main objective in the mouse model will be to confirm improved results found in the rat model and to investigate a genetic involvement in the mechanism of action. Intervention studies will be carried out with:

- Knock-out genes. To investigate the proposed mechanisms of successful interventions an important tool is the use of transgenic mice. The interaction between the gut microbiota and the immune system is important for the development of mucositis. Therefore, we will study knock out models of genes encoding for receptors which are important for the interaction of this interaction (██████████). On the other hand the inflammatory response could be hypothesized to be the major contributor to the development of mucositis and a knock-out of a central gene (██████████) could reduce the severity of the mucositis. More genes of interest will be decided during the course of the study, depending on new literature and results of above mentioned studies.

Since the mouse model will be employed to investigate genetic involvement in the mechanism of action of the interventions which were successful, we will need to confirm whether these interventions are successful in mice as well.

- Anti-, Pro-, pre- or synbiotics. These are interventions aimed to enlarge the bacterial population of the microbiota and/or to change its composition. Probiotics are one or more bacterial strains which are given via oral gavage, prebiotics are substances (██████████) which can be given in the nutrition or via oral gavage and synbiotics are a combinations of the two. Depending on the aim of the experiment these will be

- given once or multiple times during the experiment.
- Drugs aimed to influence the inflammatory response. These drugs will most likely be given via an (intravenous, intraperitoneal or subcutaneous) injection, depending on the optimal route of the intervention, as a prophylaxis or therapy. With these studies we aim to influence the inflammatory response in a beneficial way to limit the damage done during mucositis or to fasten the recovery ( ).
  - Drugs targeting the intestinal barrier. Drugs improving the intestinal barrier will also most likely be given via an injection, although certain drugs could potentially be given via oral gavage or in the food/drinking water, given as prophylaxis or therapy. These drugs aim to prevent or limit the disruption of the intestinal barrier during the ulceration phase of mucositis (for example drugs enhancing tight junctions).
  - Nutrition. Nutritional interventions are focussed on supplementation of nutrients to food/water. ( )
  - ( )

MTX will be administered under general anaesthesia and the mice are followed during the development and recovery of mucositis. Throughout the whole experiment body weight, intake and the presence of diarrhoea are measured. Blood will be drawn to assess the plasma citrulline levels and faecal samples will be collected to investigate the gut microbiota during the experiment. Animals will be sacrificed on points of interest which depend on the aim of the experiment.

During some experiments animals might receive two cycles of chemotherapy to investigate the effect of successful interventions during a second cycle of chemotherapy. The effect of successful intervention during two cycles will be investigated since patients also receive multiple during the treatment of their tumour.

The night before the animals are sacrificed the animals are fasted since this is needed to perform a glucose absorption test to investigate the function of the intestine. For this test the animals receive a bolus of labelled glucose via oral gavage and the blood glucose levels will be monitored via repeated collection of blood via the tail vein.

---

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

Before each experiment a sample size calculation based on a power assessment with historical data from our laboratory (expected effect size and standard deviation of histology, blood citrulline levels, etc) will be performed to determine the group size of the animals. To reduce the amount of animals needed, the course of chemotherapy-induced mucositis will in general be monitored by blood citrulline levels, while histology is performed on a time point of interest.

## **B. The animals**

---

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

Both WT and transgenic male mice will be used in this mouse model of chemotherapy-induced mucositis. The strain and life stage of the mice will be determined during the development of the mice model. Male mice will be used to keep rat and mouse model as similar as possible. Since mucositis is a multifactorial in their development adding another variable (male vs female) into the equation would increase the variation too much. The mice will be purchased from commercial sources both from inside and outside of the EU. The life stage of the animals is post-weaning and young adults depending on the aim of the experiment.



The exact number of mice needed for each experiment will be calculated with a sample size calculation based on historical data from our laboratory and a power assessment. Since the model still needs to be developed an estimation of the amount of mice needed in total is hard and this depends on the number of experiments needed to optimize the model. We estimate that in total 360 mice are needed, 120 of which for the development of the mice model.

### C. Re-use

Will the animals be re-used?

No, continue with question D.

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

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

No

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

### D. Replacement, reduction, refinement

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

Replacement: The goal of this project is to ameliorate the course of chemotherapy-induced mucositis. Mucositis is a multifactorial process which involves many different established contributors (intestinal epithelium, immune system and nutrition) which are hard to mimic in vitro. On top of that we will investigate the role of the intestinal microbiota. Therefore, an accurate in vitro model which combines all these factors is impossible to accomplish. The experiments are clearly too invasive to be able to investigate them in the human situation. Therefore, an animal model of chemotherapy-induced mucositis is needed. The availability of transgenic rats is very limited. To be able to investigate the involvement of specific genes in successful interventions a mice model would be necessary.

Reduction: Experiments during which animals are sacrificed at two or more time points compared to the control group(s) will, when the experimental aim allows this, not be measured on each time point since the control animals do not change during the experiment. Also parameters which do not require the animals to be sacrificed are assessed whenever appropriate, for example citrulline in blood samples and faeces samples.

Refinement: The model will be designed to minimize discomfort and stress for the animals. Anaesthesia and analgesia will be used whenever appropriate to minimize stress and discomfort.

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

The animals are handled often to minimize stress and discomfort during weighing or while being transferred. On top of that, animals are monitored frequently to identify potential discomfort as soon as possible. Anaesthesia and analgesia are given whenever needed. Potential environmental-polluting waste will be collected appropriately.

## 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.

Several possible interventions are investigated which could potentially ameliorate the course of severe mucositis. The role of microbiota during the development and recovery of chemotherapy-induced mucositis has not yet been extensively investigated. The research that has been done so far showed potential but due to flaws in the experimental design results are not solid enough to allow direct translation to humans. Some studies report nutritional interventions. However, these studies have so far focused on amino acid supplementation, other nutrients or combinations have hardly been studied.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

Is the housing and care of the animals used in experimental procedures not in accordance with Annex III 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 will be housed individually. This is needed since we want to measure food intake, water intake and some experiments require supplementation to the water/food (for example antibiotics).

### 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 be anesthetized with Isoflurane/oxygen by or under supervision of experienced employees. Analgesia will be used if needed.

### **I. Other aspects compromising the welfare of the animals**

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

After administration of chemotherapeutic agent the mice will have several days of lowered intake, weight loss (<10%), diarrhoea and general sickness. We expect the adverse effects of WT mice welfare be similar to the adverse effects of the rat model. Genetic effects present in transgenic mice might possibly compromise welfare of the animals. However, these effects are impossible to describe now since missing gene will be determined based on results of experiments performed in this project. The mice used in this project will be already established transgenic mice strains. How these transgenic strains fare after the administration of chemotherapy could go both ways, depending on the missing gene and the mechanism we want to investigate. A gene maybe need to be inhibited/induced to improve the course of mucositis, a transgenic mice might genetically have an beneficial/worse outcome.

Explain why these effects may emerge.

The goal of our project is to change to course of chemotherapy-induced mucositis, the symptoms of mucositis are an impaired uptake of nutrients and a general sickness. Due to an impaired uptake of nutrients more water will be attracted to the faeces which results in diarrhoea. Combined the general sickness and diarrhoea lead to weight loss.

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

The interventions which are investigated are aimed to prevent occurrence or minimise severity of the mucositis. Also chemotherapy will be given at a dose which ensures the mucositis is self-limiting as it is in patients.

### **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.

When signs of severe complications, like severe weight loss (>15%) and general severe malaise (behavior, fur, hygiene) the mice will be sacrificed due to humane endpoints. After chemotherapy-injection the mice will be investigated daily.

Indicate the likely incidence.

<5% of the mice which receive chemotherapy

### **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').

Non-recovery: collection of organs after being sacrificed

Mild: individual housing, transport during experiments, oral gavage, collection of blood from tail vein, injection of intervention (IV,IP,SC), dexa-scan or nuclear magnetic resonance spectroscopy, faecal transfer, repeated collection of blood during glucose absorption test and fasting

Moderate: Administration of chemotherapy/NaCl via injection and experiencing mucositis.

The overall expected level of discomfort is moderate. The animals will be closely monitored after administration of chemotherapy until the end of 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.

To be able to investigate the histology of the intestine to evaluate the mucositis and its recovery and to collect the content of the gastrointestinal tract to evaluate the gut microbiota. Other organs are also investigated and harvested depending on the research question

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

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

Yes

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1  
9713 AV GRONINGEN

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD105002015338

**Uw referentie**

**18 JAN. 2016**

Datum:

Betreft: Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**

1

Geachte

Op 27 november 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "To change the course of chemotherapy-induced mucositis" met aanvraagnummer AVD105002015338. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 21 december 2015 hebben wij u per mail een aantal vragen gesteld. U heeft op basis van de vragen de aanvraag aangepast en ons op 22 december 2015 de projectaanvraag toegezonden met uw antwoorden daarin verwerkt.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). U kunt met uw project "To change the course of chemotherapy-induced mucositis" starten. De vergunning wordt afgegeven van 19 januari 2016 tot en met 1 december 2020. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt. Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG gevoegd. Dit advies is opgesteld op 24 november 2015. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij hebben de DEC om aanvullende informatie gevraagd. Op 21 december 2015 heeft de DEC gereageerd op onze vragen, het antwoord was voldoende duidelijk.

In het advies van de DEC staat een beperkende voorwaarde vermeld. De noodzaak tot deze voorwaarde is vervallen omdat het projectvoorstel is aangepast en de projectaanvraag nu enkel het gebruik van methotrexaat beschrijft en hiermee aan de voorwaarde van de DEC wordt voldaan. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Wij nemen dit advies van de commissie over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Dit advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit. Met het oog op artikel 10a. van de wet worden aan meerjarige projecten twee algemene voorwaarden gesteld.

**Datum**

18 januari 2016

**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD105002015338**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.

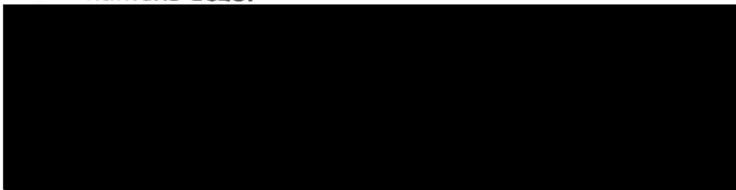
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op <http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

**Meer informatie**

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

Met vriendelijke groet,

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

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

**Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: Rijksuniversiteit Groningen  
Adres: A. Deusinglaan 1  
Postcode en woonplaats: 9713 AV Groningen  
Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 19 januari 2016 tot en met 1 december 2020 voor het project "To change the course of chemotherapy-induced mucositis" met aanvraagnummer AVD105002015338, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG.  
De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 27 november 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 22 december 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 22 december 2015;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 24 november 2015, ontvangen op 27 november 2015;
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag, antwoorden via de mail ontvangen op 22 december 2015.

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
Chemotherapy-induced mucositis rat model	Ratten ( <i>Rattus norvegicus</i> ) / wild typw wistar	720	Matig
Chemotherapy-induced mucositis mouse model	Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / Wild type en genetisch gemodificeerd	360	Matig

### Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen  
De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden genomen met instemming van de IvD.

In artikel 10, lid 1a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

## Weergave wet- en regelgeving

### Dit project en wijzigingen

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

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

### Verzorging

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

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

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

### Pijnbestrijding en verdoving

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving 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 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



**Datum**

18 januari 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD105002015338

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.

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** donderdag 28 januari 2016 16:39  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** terugkoppeling AVD105002015338

Geachte leden van DEC RUG,

Bij de CCD is een aanvraag tot projectvergunning aangeboden waarover uw Dec advies heeft uitgebracht. Het betreft het project To change the course of chemotherapy-induced mucositis met aanvraagnummer AVD105002015338. Er zijn aan uw DEC. Daarnaast zijn aan de aanvrager een aantal vragen gesteld, daarvan hebben wij gedurende het behandeltraject uw DEC op de hoogte gesteld. Aanvrager heeft de vrager voldoende beantwoord en de documenten aangepast.

De CCD heeft besloten de aanvraag na de aanpassingen te vergunnen en hierbij uw advies gevolgd.

Met vriendelijke groet, [REDACTED]

**Centrale Commissie Dierproeven**  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

T: 0900 2800028

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

Inventaris Wob-verzoek W16-07S									
		wordt verstrekt				weigeringsgronden			
nr.	document	reeds openbaar	niet	geheel	deels	10.1.c	10.2.e	10.2.g	11.1
	<b>NTS2015339</b>								
1	Aanvraagformulier				x		x	x	
2	Projectvoorstel				x			x	
3	Niet-technische samenvatting	x							
4	Bijlage beschrijving dierproeven 1				x			x	
5	Bijlage beschrijving dierproeven 2				x			x	
6	Bijlage beschrijving dierproeven 3				x			x	
7	DEC-advies				x		x	x	
8	Ontvangstbevestiging				x		x	x	
9	Communicatie aanvrager voorgenomen besluit				x		x	x	
10	Vragen antwoorden DEC				x		x	x	
11	Advies CCD		x						x
12	Beschikking en vergunning				x		x	x	
13	Mail terugkoppeling DEC 20-1-2016				x		x	x	



04 DEC. 2015

AVD 105002015339

## 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](http://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   10500 <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen	
1.2	Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.	Naam instelling of organisatie	Rijks Universiteit Groningen
		Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde	[REDACTED]
		KvK-nummer	01179037
		Straat en huisnummer	A. Deusinglaan 1, [REDACTED]
1.3	Vul de gegevens van het postadres in. <i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i>	Postbus	
		Postcode en plaats	9713 AV   Groningen
		IBAN	NL80ABNA0446049352
		Tenaamstelling van het rekeningnummer	Rijksuniversiteit Groningen
1.4	Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]
1.5	<i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.	(Titel) Naam en voorletters	[REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.
		Functie	[REDACTED]
		Afdeling	[REDACTED]
		Telefoonnummer	[REDACTED]
		E-mailadres	[REDACTED]

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.
- |                             |  |  |
|-----------------------------|--|--|
| (Titel) Naam en voorletters |  | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     |  |  |
| Afdeling                    |  |  |
| Telefoonnummer              |  |  |
| E-mailadres                 |  |  |
- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?
- 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 - 1 - 2016   |
| Einddatum  | 31 - 12 - 2020 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Cellular senescence in aging and cancer
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Cellulaire veroudering tijdens algemene veroudering en bij kanker
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                                     |
|-------------|-------------------------------------|
| Naam DEC    | DEC-RUG                             |
| Postadres   | A. Deusinglaan 1, 9713 AV GRONINGEN |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl                |

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 741 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

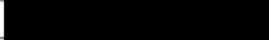
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de bevestigde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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

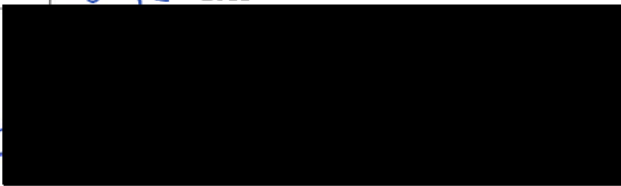
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
- dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan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

Naam 

Functie 

Plaats Groningen

Datum 03-12-2015

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](http://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.

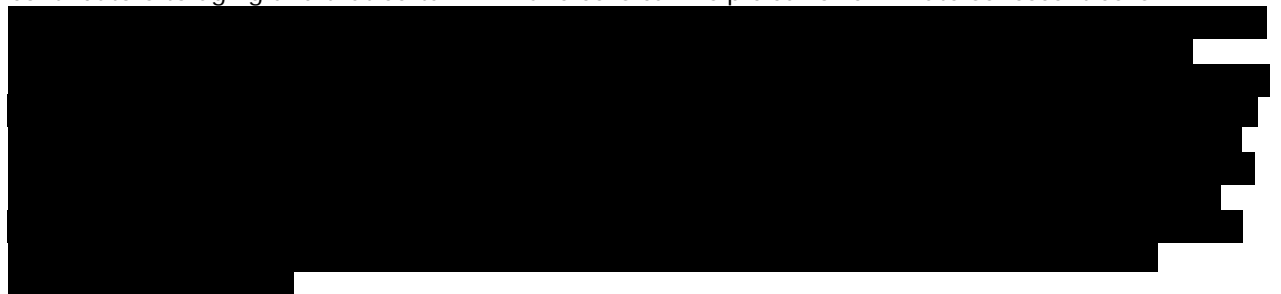
- For legally required animal procedures, indicate which statutory or regulatory requirements apply (with respect to the intended use and market authorisation).
- For routine production, describe what will be produced and for which uses.
- For higher education or training, explain why this project is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

Cellular senescence is a potent and critically important anti-cancer mechanism that causes cells to irreversibly lose the ability to divide. Despite this beneficial aspect of cellular senescence, the accumulation of senescent cells in mammals has long been hypothesized to explain in part why we age. This 'trade-off' between beneficial and deleterious effects of an anti-cancer mechanism is consistent

with a major classical evolutionary theory of aging.

The transformation of a dividing cell into a senescent cell can occur via different mechanisms, including stresses that damage DNA, such as telomere shortening, UV radiation and chemotherapy. Why might senescent cells promote aging in organisms such as mice and humans? Senescent cells have several potentially harmful characteristics, including the secretion of pro-inflammatory proteins and other factors that can disrupt tissue, leading to cancer progression or loss of function of various tissues. On the other hand, a transient accumulation of senescent cells during tissue repair has been demonstrated to be potentially important to limit the fibrosis after damage.

There is a great deal of cell culture data that support the idea that senescent cells are important contributors to aging and that certain immune cells can help clear or eliminate senescent cells.



Using this animal model, we have been able in the past 5 years to demonstrate the following:

- Senescent cells are accumulated with age. A significant induction of senescence is detectable starting from 16 months of age and the number of senescent cells increase with time;
- Senescent cells are induced by ionizing radiation and chemotherapy, 2 different standard anti-cancer and DNA damaging insults, and can persist in tissues for long (> 3 months);
- Therapy-induced senescent cells contributes to several side effects associated with the anti-cancer treatment, such as fatigue, strength and metabolism;
- Therapy-induced senescent cells promotes cancer relapse and cancer metastasis;
- During skin wound healing, senescent cells are transiently induced and are able to promote optimal cutaneous wound healing.

Now, we aim to further understand the complex roles of senescent cells in vivo, both beneficial and detrimental, and to study how different stimuli can promote senescent cells with different phenotypes. The short-term goal of the outlined projects is to isolate the cellular and molecular mechanisms by which senescent cells can promote aging, age-related pathologies, including cancer, and side effects of chemotherapy, from the beneficial role during tissue repair.

The long-term goal of the lab is to target senescent cells and their secretory phenotype and to generate new interventions aimed at delaying or preventing aging.

The future plan includes testing different hypothesis, which derive from preliminary data we have obtained either in vivo or in cell culture, using the skin as the reference tissue. We think that using the skin to test our hypothesis is supported by the following:

- There is a dual and opposite role of transient (wound healing) vs persistent senescent cells (cancer promotion – melanoma);
- Senescent cells accumulate in the skin with age and with chemotherapy;
- Aging of the skin is promoted by either intrinsic (chronological) or extrinsic factors (UV radiation), which well mimics human aging;
- Aging of the skin shares several basic principles with other disease involving connective tissue (osteoarthritis, atherosclerosis), making our discoveries highly adaptable to other systems;
- Age-associated disorders of the skin are easy to monitor and poorly invasive;
- Skin cancer incidence exponentially increases with age and it's the most common of all cancers. Moreover, the survival rate for patients with late stage metastatic melanoma is only 15-20% over a 5 years period;
- Current therapies rely on drugs (chemotherapy) with several side effects; including nausea, fatigue, and decline in muscle mass.

Our goal is to perform experiments to study the physiology and pathology of the skin in regards of the senescent cells phenotype. Moreover, we aim to better characterize the role of senescent cells in promoting side effects of chemotherapy, since treatment with cytotoxic drugs is limited by toxicity and off-target effects. Being able to identify new potential molecular targets based on the signature of



senescent cells will not only candidate senescent cells for new combinatorial therapies, but will have a big impact on the well-being of the patients going through anti-aging or anti-cancer interventions.

In summary, the hypothesis we have generated are the following:

- First, senescent cells that chronically accumulate in an organism after aging or external DNA damaging insults promote age-related phenotypes in the skin and other tissues;
- Second, senescent cells that chronically accumulate in an organism after aging or external DNA damaging insults promote cancer and contribute to adverse reactions of anti-cancer therapies

### 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 objective of this project is to understand the complex roles of senescent cells in vivo, both beneficial and detrimental, and to study how different stimuli can promote senescent cells with different phenotypes, with particular focus on aging and cancer. For this purpose we have established the following aims which we will address in the upcoming 5 years:

**1) Determine the extent to which chronically present senescent cells promote physiological skin aging, induced either by intrinsic or extrinsic factors.**

The *objective* of these projects is to characterize the role of senescent cells in promoting skin aging. Our *working hypothesis* is that chronic senescent cells induced by age, UV radiation or chemotherapy secrete factors in the local or systemic microenvironment which can serve as targets for novel therapeutic interventions for the treatment of different pathology of the skin.

**2) Study the natural and artificial elimination of senescent cells from the skin.**

The *objective* of this project is to identify the timing and the efficiency of naturally or artificially clearing senescent cells from the skin. Our *working hypothesis* is that chronic senescent cells induced by age, UV or chemotherapy are inefficiently removed and slowly accumulate in the skin, while acute senescent cells induced by wound healing are efficiently eliminated.

**3) Determine the extent to which chronically-induced senescent cells promote melanoma and adverse reactions to the therapy.**

The *objective* of this project is to characterize the role of senescent cells in promoting melanoma progression and adverse reactions to chemotherapy. Our *working hypothesis* is that the elimination of chronic senescent cells will decrease tumor progression and metastasis, and ameliorate the general health span of the animal through mitigation of side effects.

Our lab has 10+ years of experience in working with cellular senescence and the skin, has developed mouse models that will be used for these projects, and has invested very substantially in the various technical approaches that are required to complete this research project. These include treatment with damaging agents, wound healing, cells transplant, xenotransplant of cancer cells, induction of melanoma. Collectively, the availability of this methodology ensures feasibility of the proposed studies.

### 3.3 Relevance

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

The population in many parts of the world, including the Netherlands, is gradually aging. Life expectancy has increased by ~40 years in the last 150 years, and all evidence suggests that a further increase will take place. Unfortunately, this is accompanied by a larger population in need of medical treatments for the cure of several age-associated diseases. Among those, cancer is a devastating plague of our society, and for skin cancers, which count for the most represented cancers in the population, the rate of survival is very low when metastatic. Cancer treatments are often very toxic, and side effects often lead to the discontinuation of certain therapies, such as chemotherapy, in a large number of patients. Senescent cells are accumulated with age and after damaging anti-cancer therapies and cause several phenotypic changes in the tissues, including promotion of pro-inflammatory environment. Understanding why

senescent cells accumulate, the mechanisms that promote their aberrant behaviour and ways to counteract their harmful effect, represent an attractive avenue to develop new anti-aging and anti-cancer approaches.

### 3.4 Research strategy

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

The various aims that are as described in paragraph 3.2 will be pursued in parallel. Indeed, a specific aim might not only generate important data for the other aims, but also benefit from the other projects. This makes the overall project more harmonious and more focused on answering the main questions we hope to address. Different PhD students will be in charge of developing different tools we will be using for the project, and supported by a permanent team of experienced research technicians.

#### 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.

This proposal is divided in 3 different aims, which are detailed below. A combination of different animal procedures, which are explained in detail in the Appendix, will be employed in the 3 research questions. As a common tool to answer the following questions, we will use a new mouse model, the p16-3MR, that was recently developed by us (*Demaria et al, Dev Cell, 2014. 31:722-33*) and briefly described in Section 3.1. Of particular relevance for this proposal, using the p16-3MR mice we have been able to detect (by bio-luminescence) and inducibly eliminate (by ganciclovir administration) senescent cells generated by wound healing, ionizing radiation, aging and chemotherapy (*Demaria et al, Dev Cell, 2014. 31:722-33; Demaria et al, in preparation*). Moreover, we have been able to sort senescent cells from the skin of p16-3MR mice by exploiting the RFP portion of the transgene (*Demaria et al, Dev Cell, 2014. 31:722-33*). Thus, we believe the p16-3MR model represents a powerful and proved model to understand the role of senescent cells in vivo, and of exquisite and unique value for the aims here described:

#### **1) Determine the extent to which chronically present senescent cells promote physiological skin aging, induced either by intrinsic or extrinsic factors.**

During this project, we will characterize how and where senescent cells accumulate in the skin, and how their presence affects the skin physiology. We will study the skin of young (3-4 mos), middle age (12-16 mos) or old (20-26 mos) animals, of mice treated with UV or chemotherapy (██████████, ██████████) and of mice with small wounds (Appendix 1 – Induction and detection of senescence). Skin will be excised from different areas (Appendix 1) and fixed or cells isolated. We will perform histology and staining for different senescence markers, and to get more insights on the different factors induced in the skin, we will perform an unbiased characterization of the gene expression profiling using whole transcriptome sequencing and further validations. For doing these experiments we will use p16-3MR mice, which have the advantage of express a senescence-specific RFP and where we can artificially eliminate senescent cells by i.p. injections of the pro-drug Ganciclovir (GCV), and skh-1 mice (hairless – *Bissett et al, Photoch and Photobio, 1987. 46:367-378*), which represents a model where we can study the skin without shaving hair and causing small damages that can interfere with our finding.

At the end of this project we will have better insights of the factors and mechanisms involved during senescence-driven skin aging, identifying the genes and pathways which are specific of the chronic senescent cells and potentially discovering new candidates for the development of future targeted therapies for skin pathology.

#### **2) Study the natural and artificial elimination of senescent cells from the skin.**

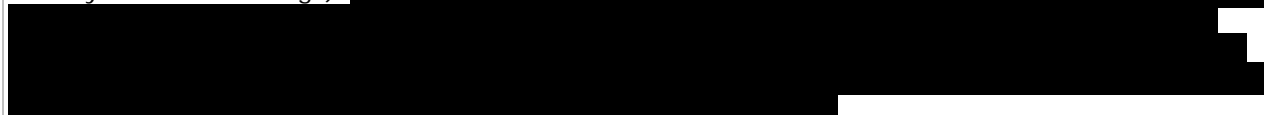
During this project, we will measure the time needed to eliminate senescent cells from the skin. ██████████

██████████ Since we think that age impairs the rate of senescent cells clearance, while tissue repair accelerates, we will test the hypothesis that the clearance of senescent cells is dependent on the physiology of the skin. We will collect small biopsies of skin at different time points in order to determine the level of response of the immune system by histology and gene expression. Moreover, we will test whether previously characterized senolytic drugs (i.e. drugs that can specifically eliminate

senescent cells in other systems) are able to accelerate the removal of senescent cells from the skin (Appendix 2). For the whole project, we will use both C57BL6 mice. At the end of this project we will have better insights of the efficiency in eliminating physiologically or pathologically induced senescent cells, and of differences between transient and chronic senescent cells removal.

**3) Determine the extent to which chronically-induced senescent cells promote melanoma and adverse reactions to anti-cancer therapy.**

Different preliminary data on the role of senescent cells in promoting melanoma metastasis were obtained using an orthotopic system (by injecting B16 cells, which already are highly metastatic and directly colonize the lungs).



In the first setting, we will determine whether senescent cells chronically accumulated (with the stimuli described in Appendix 1) can enhance melanoma aggressiveness, quantified by metastasis in distal tissues (Appendix 3 - Melanoma and chemotherapy side effects). In the second setting, we will investigate whether therapy-induced senescent cells (UV radiation and/or chemotherapy) can promote adverse reactions, quantified by different metabolic and behavioral tests (Appendix 3).

At the end of this project we will have better insights on the impact of removing senescent cells induced by different meaning to reduce cancer burden and chemotherapy side effects, which could candidate the targeting of senescent cells as an innovative approach for the cure of skin cancers.

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 projects are focused on the central question as to how senescent cells are generated by different stimuli, and how they can contribute to different age-related pathologies, including cancer. The final goal will be to find molecular and cellular signatures that will be helpful to target the senescent cells with aberrant behaviours. The different aims listed in this proposal need extensive cross-talks, but will be investigated serially. Indeed, we plan to first setup our conditions to induce and detect senescence (Appendix 1). After the setup is completed, we will then move to the other 2 Aims, starting with the study of senescent cells clearance from the skin (Appendix 2) and followed by the characterization of senescent cells in the context of skin cancer (Appendix 3).

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	Induction and detection of senescence
2	Injection of senescent cells in the skin
3	Melanoma and chemotherapy side effects
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.zbo-ccd.nl](http://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'.	10500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Rijks Universiteit Groningen	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	1	Induction and detection of senescence

*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 primary goal of this project is to induce cellular senescence in the skin to measure the impact of senescent cells for tissue homeostasis. Secondary outcome parameters of these experiments are the correlation between the number of senescent cells and the phenotype of the skin, and to isolate the senescent cells generated for further molecular analysis. We will test the hypothesis that chronically-induced senescent cells promote deleterious phenotypes in the skin, and that their elimination can be exploited for future therapies. In order to cover different stresses that induce phenotypes of the skin in humans,

we will not only analyse the skin of old vs young mice, but also of mice treated with UV radiation (the most important environmental stress for skin aging) and chemotherapy (the most used anti-cancer treatment) and compare these chronically-induced senescent cells to the ones generated during wound healing, which we know being transient and beneficial for the process of optimal repair.

During the course of the experiments, we will regularly monitor the mice for senescence induction by in vivo bio-luminescence, as described in the next paragraph. During and at the end of each experiment we will collect skin biopsies from the dorsal skin. These biopsies will be used to: 1) extract RNA and proteins to measure different parameters of cellular senescence and skin health; 2) do immunohistochemistry and histology to determine the quality of the skin, the cellular and the extracellular matrix composition compositions, the presence of senescent cells and the number of immune cells; 3) isolate senescent cells by FACS sorting for further analysis and characterization.

---

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

We will have 4 different approaches to induce senescence. During these approaches, we will also monitor the bioluminescence of living p16-3MR mice, which express Renilla luciferase in a senescence-specific control. Since this is a non-invasive technique, we don't expect to have confounding results by using for further experiment the mice that are monitored.

The 4 approaches are:

- 1) Natural aging. Animals will be aged without any intervention. In the case of p16-3MR mice, where the treatment with Ganciclovir (GCV) can remove senescent cells, we will i.p. inject the animals with 25 mg/kg of GCV once daily for 5 consecutive days every 2 months starting at 12 months of age. Small biopsies of the dorsal skin (1-2 mm) will be collected between 4-6 months of age, 12-16 months of age, and 20-26 months of age. With these ages we should have a good range to cover young, middle age and old animals. The total number of groups will be 1, but we will double the number of animals since we expect to lose 50% of the cohort due to natural causes.
- 2) UV-radiation. The exposure to UV light will be limited to a small area of the dorsal skin (around 1 cm<sup>2</sup>). [REDACTED] Small biopsies of the dorsal skin (1-2 mm) will be collected at different time points during the experiment. This approach is necessary to mimic different sun exposure in the human population. In the case of p16-3MR mice, we will i.p. inject the animals with 25 mg/kg of GCV once daily for 5 consecutive days every 5 weeks (for regimen 1), every 3 weeks (for regimen 2) or after the end of the treatment only (for regimen 3). The total number of groups will be 4 (3 regimens + control).
- 3) Chemotherapy. [REDACTED] The choice of the drugs and the regimen is based on the chemotherapy regimen used in the clinic for skin cancer treatment. In the case of p16-3MR mice, we will i.p. inject the animals with 25 mg/kg of GCV once daily for 5 consecutive days 1 week after the end of each treatment. The total number of groups will be 4 (3 drugs + control).
- 4) Wound healing. Hair will be shaved from dorsal skin of the animals. The surgery site will be disinfected with alternating Betadine and 70% ethanol wash, then a small piece of dorsal skin will be punched using an 6-mm dermal biopsy punch. Mice will be euthanized at day 6, 10 and 14 after wound healing in order to collect skin biopsies. At these points, we expect induction of different type of senescent cells which we will use for comparison with the senescent cells originated in 1, 2 and 3. The total number of groups will be 4 (3 time points + control).

---

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

We are planning to use two different strains of mice, the above mentioned p16-3MR and the hairless mice skh1. The advantage of the p16-3MR mice relies on the detectability of senescent cells by bio-luminescence with a non-invasive method in living animals, and by the possibility of eliminating senescent cells by GCV. The advantage of the skh1 is that they don't need shaving of the fur, which might create confounding results due to the induction of senescence upon

tissue repair. Based on our experience and the literature, we will need 30 mice/treatment/strain, where 15 mice will be used for histology and 15 mice will be used to isolate senescent cells. A smaller number of mice (15) will be used per each group treated with GCV since we are planning to perform histology only. This will give a total of 45 p16-3MR mice/treatment and 30 skh1 mice/treatment. For the naturally aging animals, we will double the number of animals since we expect to lose 50% of the cohort due to natural causes (90 3MR and 60 skh1). However, for the wound healing intervention a smaller number of mice at each time point will be used, because this cohort will be used for isolation of senescent cells only (30 p16-3MR mice and 15 skh1 mice)

## B. The animals

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

We plan to use p16-3MR mice, which have a C57BL/6 background, and Skh1 hairless mice, which have an Albino background. The p16-3MR mice are available from different laboratories in the Netherlands (RIVM, Bilthoven; Erasmus Medical Center, Rotterdam). The skh1 are commercially available and can be purchased from Charles River ([http://www.criver.com/files/pdfs/rms/us-model-pricing/rm\\_rm\\_c\\_skh1\\_mice.aspx](http://www.criver.com/files/pdfs/rms/us-model-pricing/rm_rm_c_skh1_mice.aspx)).

As described in 2A, we aim to establish cohorts of 45 p16-3MR (30 untreated and 15 GCV-treated) and 30 skh1 mice for each treatment/intervention (with the exception of the wound healing cohort, with 15 mice/time point). Small biopsies of skin will be collected at different time points during/after treatments. We will minimize the size of the biopsy to 1-2 mm in order to reduce the invasiveness of the procedure. In our experience, mice fully recover after these small incisions in 3-5 days. Using biopsies gives us the advantage of following the progression of the skin phenotypes over-time in the same animal. To further limit the manipulation and distress of the animals we will limit the collection of biopsies at once a month. In the case of wound healing, mice will be euthanized for skin collection to avoid repetitive wounding. For the aging cohort, mice will be euthanized if signs of distress appear, but otherwise kept up to 26 months. In the case of skh1 mice the lifespan might be shorter, and we will keep the maximum age at 20 months. For the UV-treated cohort, mice will be euthanized maximum 15 weeks after the last treatment. For the chemotherapy cohort, mice will be euthanized maximum 10 weeks after the last treatment. For wound healing, mice will be euthanized maximum 3 weeks from the injury.

In total we estimate to use the following number of mice:

- P16-3MR -> 570 mice [90 animals x 1 treatment (aging) + 45 animals x 4 treatments (UV radiation) + 45 animals x 4 treatments (chemotherapy) + 30 animals x 4 time points (wound healing)]
- Skh1 -> 360 mice [60 animals x 1 treatment (aging) + 30 animals x 4 treatments (UV radiation) + 30 animals x 4 treatments (chemotherapy) + 15 animals x 4 time points (wound healing)]

We are planning to start with a small pilot (n=5) before moving to the full experiment. First, for the single cell sorting experiments, we will move to the full experiment only if able to isolate senescent cells from the skin. Second, for the evaluation of skin health, we will consider a "go" for performing the full experiment the evaluation of: 1) 10% difference in extracellular matrix composition between mice with or without senescence (measured by histology); or 2) 10% difference in cellular populations (histology/RNA); or 3) visual differences in the skin health (wrinkling, elasticity)

## 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 many data on the nature of senescent cells in vitro, but we now need to confirm the evidence collected in vivo. Moreover, the influence of cellular senescence for skin homeostasis can't be replaced with any in vitro experiment.

Reduction: We have done several experiments of gene expression profiling of isolated cells and histology/staining of whole tissues. We have substantially reduced the number of mice per group (15) at the minimal to obtain statistical significance based on data we have generated in the past. In particular, we are using our data on the induction of p16 (marker of senescence) in the skin upon age or doxorubicin (measured by RNA or protein abundance) to estimate that we will need 15 mice/group to obtain statistical significance in our experiments in terms of senescence induction. By analysing mice with different backgrounds (p16-3MR and skh1) we think we will select phenotypes which are strongly affected by senescent cells and conserved in different systems, thus increasing the statistical power substantially, and allowing us to use 'only' 15 mice in each experiment and treatment.

Refinement: All the procedures listed are meant to minimize the discomfort of the animals. We will reduce the size of the area of exposure to UV to minimize side targets of radiation. We will reduce the size of the skin biopsies to be collected at the minimal we can go for further analysis, which is the result of years of experience working with skin samples.

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

Suffering will be minimal, and most often absent. Mice will be carefully monitored using the monitoring system designed within our institute for any treatment, and any mouse experiencing unexpected suffering will be removed from the study and sacrificed

### **Repetition and duplication**

#### **E. Repetition**

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

[REDACTED]. We have established collaborations with different other labs to monitor how senescent cells impact skin phenotypes. The other labs will focus on different mouse models with specific skin disease, which will give us a more comprehensive picture of differential disease-dependent roles of senescent cells. This study will be the first analyzing effects of specific removal of senescent cells for skin phenotypes, making it unique and completely different from another study done in the field of senescent cells removal (*Baker et al, Nature, 2011. 479:232-236*).

### **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.

We will use analgesic only in case of wound healing. mice will be given analgesic during/after surgery. Since the area to be removed is small and superficial, we don't expect the need of using analgesic past the 12 hours following the surgery.

#### I. Other aspects compromising the welfare of the animals

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

Mice will be aged naturally, and are therefore expected to develop various age-related symptoms. For chemotherapy, mice will encounter mild fatigue and transient muscle weakness. Mice will fully recover 3-4 weeks after treatment. For wounding, there is a small risk (<2%) of developing infections

Explain why these effects may emerge.

For natural aging or after genotoxic drugs treatments, side effects can be due to transient anaemia, increase inflammation and impairment in the immune system functions. In case of wound healing, the wound will not be sutured to allow natural wound closure to occur

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



Mice will be inspected thoroughly throughout their lifespan and during treatment and overt diseased animals will be removed from the cohort.

#### **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.

For the aging cohort, we will monitor persistent loss of weight at monthly intervals, and assess deviant behavior and cachexia development according to the system set up in the facility. For the chemotherapy experiments, we will monitor the weight twice weekly, and increase to more frequent measures if necessary (if the body weight drops of more than 10%)

Indicate the likely incidence.

For aged mice the incidence of age-associated pathology is (obviously) high. Careful (monthly) monitoring, most notably towards the end of their natural lifespan, should allow us to sacrifice most animals prior to the onset of the humane endpoints. For chemotherapy-treated mice, the incidence of drug-related fatigue is high. Mice will be carefully monitored on a daily basis and animals showing humane endpoints will be sacrificed. For wounding, there is a small risk (<2%) of developing infections

#### **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').

Mild for wound healing, moderate for chemotherapy and non-recovery for the aging study

### **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.

For the vast majority of the mice, we will not need to sacrifice the animals because we will only collect skin biopsies. A small subset of each group will be killed in order to collect additional organs for gene expression analysis

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

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

Yes



## Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.zbo-ccd.nl](http://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'.	10500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Rijks Universiteit Groningen	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	2	Injection of senescent cells in the skin

*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 primary goal of these experiments is to study the clearance of senescent cells from the skin. The secondary goal is to test whether we can accelerate the removal of senescent cells by administering a drug known to be specific in killing senescent cells in other systems. Preliminary data we and other generated suggest that age delays the clearance of senescent cells, while wound healing accelerates it. We will now test this hypothesis using C57BL6 mice, and using dermal cells derived from the p16-3MR which can be monitored by bio-luminescence and inducibly eliminated. We will collect skin biopsies at different time

points during the course of the experiment. The biopsies will be used to: 1) extract RNA and protein to monitor for inflammation, proliferation and senescence; 2) perform immunohistochemistry, histology and immunostaining to determine the levels of proliferation, senescence, immune cells invasion, apoptosis, autophagy and necrosis

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

The procedure of injecting dermal 3MR cells (fibroblasts) in the skin is quite simple. The cells will be induced to senescence in cell culture (by replicative exhaustion, UV-radiation or chemotherapy), counted and resuspended in PBS in sterile conditions. Cells will be then inoculated with a syringe on the dorsal skin of young (3-4 mos), middle age (12-16 mos) and old (20-26 mos) animals, or in wounded skin, by injecting them sub-cutaneously. We have used similar approaches to inject senescent cells under the skin in the past, and being able to show that cells of dermal origins will persist in the engraftment for several days. Wound healing will be induced using a 6-mm dermal biopsy punch on the dorsal skin. A subset of mice per each group will be treated with GCV (1 daily i.p. injection of 25 mg/kg for 5 consecutive days, 3 days after cells inoculation) or with the drug [REDACTED]

[REDACTED] During these experiments, we will monitor the bioluminescence of p16-3MR cells, which express Renilla luciferase in a senescence-specific control. With this approach we will be able to monitor senescent cells clearance occurring naturally or artificially. For this reason, 5 different time points after the inoculation of cells (1, 3, 7, 14 and 28 days) will be chosen to collect the area of the skin with the inoculated cells of the untreated animals to monitor immune cells infiltration and other events related to the elimination of senescent cells (apoptosis, necrosis, autophagy). The skin of the animals treated with GCV or [REDACTED] will be collected only when we observe the total clearance of senescent cells by bioluminescence.

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

We are planning to use WT C57BL/6 mice and inoculate p-16-3MR cells. The advantage of using these cells relies on the detectability of senescent cells by bio-luminescence with a non-invasive method in living animals, and by the possibility of eliminating the senescent cells by GCV. This will allow to substantially reducing the number of animals needed. Based on our experience and the literature, we will need 15 mice/treatment/time point to monitor senescent cells and isolate the skin for further analysis. This number is based on previous experiments for determining artificial senescent cell clearance [REDACTED]

We will then have 8 treatments/time points (control; 1, 3, 7, 14, 28 days after cell inoculation; [REDACTED]) in young, middle age, old or wounded animals

## **B. The animals**

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

We plan to use C57BL/6 mice, which are syngeneic for the p16-3MR cells. These mice are commercially available or can be easily obtained at the animal Facility of the UMCG. We will use female mice, as for our previous experience they tend not to scratch their back upon injury and not to fight as much as male mice (which can delay the wound healing process).

Small biopsies of skin will be collected at different time points after the inoculation of senescent cells (1, 3, 7, 14 and 28 days). We will minimize the size of the biopsy to circa 3 mm in order to reduce the invasiveness of the procedure. A subset of mice will be euthanized at the time of collection. If not, mice will be monitored for longer times for up to 3 months (by bioluminescence). In our experience, mice fully recover after these small incisions in 5-6 days.

In total we estimate to use the following number of mice:

- WT C57BL/6 -> 480 (8 treatments/time points x 4 conditions x 15 mice/group)

We are planning to use 5 mice/group in a pilot study. During this pilot, we will need to be able to detect senescent cells by bio-luminescence and to see a response in terms of clearance (at least 40% of senescent cells eliminated) [REDACTED] before moving to the full experiment.

### 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: Clearance of senescent cells has been suggested to be due to different mechanisms. These mechanisms require massive interactions with the tissue microenvironment, including direct contact with other cell types and activation of immune system. Thus, the study of cellular senescence in terms of clearance is not possible in other systems than a mammal with an intact immune system.

Reduction: In order to reduce the number of animals to enrol in the study, we have decided to use cells derived from p16-3MR animals. This allows us to use the animal to monitor the disappearance of the cells in vivo, and to use the same animal for additional studies after biopsies. By monitoring the clearance through bio-luminescence and the level of infiltration of immune cells and other parameters related to cell clearance (apoptosis, necrosis, autophagy) in the same animal will allow to directly report the level of clearance to the potential mechanisms that participate, thus maximizing the biological information that we can derive from the experiment.

Refinement: All the procedures listed are meant to minimize the discomfort of the animals, particularly in regards of wound healing and collection of skin samples We will reduce the size of the skin biopsies to be collected at the minimal we can go for further analysis, which is the result of years of experience working with skin samples.

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

Suffering will be minimal, and most often absent. Mice will be carefully monitored using the monitoring system designed for aging mice within our institute for any treatment. Any mouse experiencing unexpected suffering will be removed from the study and sacrificed

## 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.

We have generated the p16-3MR transgenic mice, and we have the advantage to have extensive experience working with the model. We have established a collaboration with other Institutes which will define the level of clearance in other tissues, including liver and eyes. This study will be the first analyzing the efficiency of removal of senescent cells from the skin, making it unique and completely different from other studies we are aware of from collaborators and Pubmed literature searches.

## 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.

Mice that develop discomfort in the course of the natural ageing process or after wounding will be removed from the cohort

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?

Aged animals are expected to develop various age-related symptoms. For mice with wounds, a small risk of developing infections exists (<2%)

Explain why these effects may emerge.

For natural aging, side effects can be due to anaemia, low blood cell counts, increase inflammation and impairment in the immune system functions. In case of wound healing, the wound will not be sutured to allow natural wound closure to occur.

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

Mice will be inspected thoroughly throughout their lifespan and overt diseased animals will be removed from the cohort.

### **J. Humane endpoints**

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

No > Continue with question K.

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

We will monitor persistent loss of weight at monthly intervals, and assess deviant behavior, cachexia, tumor development, infections and necrosis according to the system set up in the Animal Facility.

Indicate the likely incidence.

For aged mice the incidence of age-associated pathology is (obviously) high. Careful (monthly) monitoring, most notably towards the end of their natural lifespan, should allow us to sacrifice most animals prior to the onset of the humane endpoints. For infections in wounds, we have an extensive experience and the calculate incidence is very low (<2%)

### **K. Classification of severity of procedures**

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

mild and non-recovery

## **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.

Harvesting of bigger areas of skin requires sacrificing **of** mice.

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](http://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'.	10500	
1.2 Provide the name of the licenced establishment.	Rijks Universiteit Groningen	
1.3 List the serial number and type of animal procedure.	Serial number	Type of animal procedure
	3	Melanoma and chemotherapy side effects

*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 primary goal of this project is to study whether the clearance of senescent cells induced by different stimuli is sufficient to delay progression of melanoma. The secondary goal is to test whether the presence of senescent cells contributes to side effects of standard anti-cancer therapies (chemotherapy). Preliminary data we and other generated suggest that removal of senescent cells contribute to reduce cancer spread. Moreover, we have demonstrated that doxorubicin-induced senescent cells cause fatigue of treated mice, and their removal can ameliorate physical activity. Now we want to: 1)



Study the contribution of senescent cells induced by age, UV-radiation or chemotherapy to the progression of naturally occurring melanomas (in a transgenic model); 2) Extend the characterization of the side effects of chemotherapy with rely on induction of senescent cells.

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

To study the effect of removing senescent cells on melanoma progression and chemotherapy side effects, we will use the p16-3MR mouse, which allows detection and elimination of senescent cells. We will breed the mouse into a well-established model of melanoma, [REDACTED]

[REDACTED] Since we are interested to understand the role of chronic senescence in initiating and promoting melanoma progression, we will induce 3 different approaches. In the first 2 approaches, we will ask whether the presence of senescence in the skin prior to tumor induction can create a microenvironment that favors tumor initiation and progression. Similarly to the biggest cause of skin melanoma in humans, we will use chronologic (or natural) or photoaging (UV-radiation) as inducer of senescent cells. In the second approach, we will ask whether senescent cells that are generated by therapy, after the tumor is induced, can promote cancer relapse.

- 1) Aging. Natural aging. Animals will be aged without any intervention. We will i.p. inject the animals with 25 mg/kg of GCV or with vehicle daily for 5 consecutive days every 2 months starting at 12 months of age. Cohorts of mice at 3-5 months of age (controls) and 20-26 months of age will be treated with tamoxifen to induce the melanoma. A subset of mice will be euthanized at 0, 7, 14, 21, 28 and 35 days after tamoxifen treatment and tissues extracted for further analysis to determine metastasis burden. The total number of groups will be 24.
- 2) UV-radiation. Mice will be exposed to UVA/B 4 times weekly for 12 weeks from 6 weeks of age (starting with 1 KJ/cm<sup>2</sup>/5 min up to 6 KJ/cm<sup>2</sup>/30 min). We will i.p. inject the animals daily with 25 mg/kg of GCV for 5 consecutive days every 3 weeks. After the last cycle, mice will be topically treated with Tamoxifen. A subset of mice will be euthanized at 0, 7, 14, 21, 28 and 35 days after tamoxifen treatment and tissues extracted for further analysis to determine metastasis burden. The total number of groups will be 12 (we will use same controls as for the natural aging).
- 3) Chemotherapy. Drug treatment will be given to mice in the presence or absence of melanomas. This way, we will be able to monitor different metabolic, behavioural and activity parameters differentially regulated by senescent cells per se, and discriminate these from the secondary effects due to reduced tumor burden. We will use 3-5 months old mice: half of the mice will be treated with tamoxifen, half with vehicle. 7 days later, three different drugs will be used (independently). [REDACTED]

[REDACTED]. At the end of the chemotherapy cycle, we will i.p. inject the animals with daily 25 mg/kg of GCV for 5 consecutive days 1 week after the end of each treatment. Mice without cancer (no tamoxifen treatment) will be monitored every week for up to 16 weeks (parameters/technique described below). Mice with cancer will be monitored every week for up to 4 weeks. A subset of mice carrying melanoma will be euthanized at 0, 7, 14, 21 and 28 days after the last GCV treatment. The total number of groups will be 36 (we will use same controls as for the natural aging).

For the chemotherapy experiments we will monitor the following parameters:

- Metabolism. We will use calorimetric (also defined as metabolic) cages and monitor for respiration and calorimetry (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, food, water, calories consumptions). Mice will be single housed for 4 days for acclimation in home cages before being monitored in metabolic cages for 24-48 hours.
- Activity. We will measure spontaneous activity using static running wheels. Mice will be single housed in home cages for 4 days for acclimation, followed by recording physical activity using running wheels for up to 7 times (each time for 8-12 hours at night). Mice will be kept in home single cages during the day and moved to static cages at night for recording the activity.
- Behavior. We will monitor behavior of mice using rotor-rod and open field measurements for 15-30 minutes. Despite not comprehensive, this behavioral assessment will give us an ideal pilot study to collect sufficient preliminary data for further experimentations. At this stage, we will not be able to discriminate between neurocognitive or muscular impairments, but we can expect both to be promoted by the presence of senescent cells.

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

We are planning to measure several parameters in the same animals. The design of the experiment is outlined to reduce the number of animals to the minimum. Indeed, we plan to use the same controls for multiple use, thus optimizing numbers. Based on data in cell culture and in other models, we can expect a 20-25% difference in tumor burden and response to chemotherapy between GCV and non-GCV treated animals. Thus, we have computed that 20 mice/group are needed.

## B. The animals

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

[REDACTED]

The number of mice is minimized by optimizing the experimental readout (i.e. every single mouse is monitored with different parameters). Study of cancer and effects of therapies is possible only by analysing several tissues. Thus, mice will be sacrificed at different time points to collect the tissues needed for analysis (See description in A for details).

In total we estimate to use the following number of mice:

- P16-3MR -> 360 (18 groups x 20 mice/group)
- [REDACTED] -> 1080 (54 x 20 mice/group)

We are planning to start with a subset of mice to generate preliminary data (n=6/group). We have set specific parameters to monitor in order to move to the full experiment (adding n=14/group). For aging, UV-radiation and chemotherapy we will expand our study only if we will be able to see clear differences in metastasis burden quantified as: 1) at least 20% (on average) reduction in number of metastasis in the GCV-treated mice; or 2) at least 20% (on average) reduction in size of metastasis in the GCV-treated mice; or 3) at least 1 week delay in metastasis onset in the GCV-treated mice.

## 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: Cancer and effects of cancer therapies require the study of interactions among different cells and tissues, and the impact of the circulation.

Thus, there is no alternative from using a complex organism. We minimize the use of animals to the study of very complex functions, and rely on cell culture for several preliminary data (for examples, the study how specific factors can cause survival, growth or change in metabolism in a specific cell type will be done in vitro)

Reduction: In order to reduce the number of animals to enrol in the study, we have decided to analyse several parameters in the same mouse. This allows us to use the same animal to monitor the appearance of different phenotypes related to fatigue and metastasis, and to use the same animal for additional studies after tissue collection.

Refinement: By monitoring the different parameters related to fatigue and metastasis and gene expression profiling in single animals gives us a powerful tool to phenotype the mice in relation of specific patterns of proteins and genes.

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

Suffering will be moderate, and most often minimal. Mice will be carefully monitored using the monitoring system designed within our institute for any treatment, and any mouse experiencing unexpected suffering will be removed from the study and sacrificed. Mice with cancer will be followed according to the Code of Practise Kankeronderzoek

## 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.

We have established a collaboration to test different compounds with functions in killing senescent cells (but with potential off targets effects) for the amelioration of side effects of chemotherapy. This study will be the first analyzing the genetic removal of senescent cells after chemotherapy, making it unique and completely different from other studies we are aware of from collaborators and Pubmed literature searches.

## 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.

A subset of mice will be house for 24-48 hours in metabolic (or calorimetric) cages

### 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.

We will comply with the code of Practise Kankeronderzoek

## 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.

Mice that develop discomfort in the course of the natural ageing or metastatic process will be removed from the cohort

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 aged naturally, and are therefore expected to develop various age-related symptoms. Mice with metastasis will develop different functional issues in the organs targeted by the cancer (lung, liver). The treatment with chemotherapy, despite beneficial in reducing cancer spread, will give adverse effects including fatigue and muscle weakness. The goal of our research is to demonstrate that elimination of senescent cells ameliorate these side effects, together with delaying cancer progression.

Explain why these effects may emerge.

For natural aging in the presence of tumors and after genotoxic drugs treatments, side effects can be due to transient anaemia, increase inflammation and impairment in the immune system functions.

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

Mice will be inspected thoroughly throughout their lifespan and overt diseased animals will be removed from the cohort.

### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

We will monitor persistent loss of weight at monthly intervals, and assess deviant behavior, cachexia, tumor development, infections and necrosis according to the system set up in the Animal Facility.

Indicate the likely incidence.

For aged mice and mice with cancer metastasis the risk is (obviously) high. Careful (monthly) monitoring, most notably towards the end of the experiment, should allow us to sacrifice most animals prior to the onset of the humane endpoints. For chemotherapy treatments, side effects are variable and mostly

reversible

---

**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').

moderate and non-recovery

---

### 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.

Avoid to develop too invasive phenotypes, monitored by roughing of the fur and excessive weight loss (>15%). We will comply with the code of Practise Kankeronderzoek, particularly in terms of cancer size.

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

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

Yes

---

# Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer (Interne RuG code **8038**)
2. Titel van het project: **Cellular senescence in aging and cancer**
3. Titel van de NTS **Cellulaire veroudering tijdens algemene veroudering en bij kanker**
4. Type aanvraag:
  - x **nieuwe aanvraag projectvergunning**
5. Contactgegevens DEC:
  - naam: DEC-RUG
  - telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED] / [REDACTED]
  - mailadres contactpersoon: [REDACTED]
6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):
  - ontvangen door DEC: **05-11-2015**
  - aanvraag compleet: **05-11-2015**
  - in vergadering besproken: **13-11-2015**
  - anderszins behandeld: **24-11-2015**
  - termijnonderbreking(en) van / tot: **16-11-2015 tot 17-11-2015**
  - besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen **n.v.t.**
  - aanpassing aanvraag: **17-11-2015**
  - advies aan CCD: **02-12-2015**
7. Eventueel horen van aanvrager: **n.v.t.**
  - Datum
  - Plaats
  - Aantal aanwezige DEC-leden

- Aanwezige (namens) aanvrager
- Strekking van de vraag / vragen
- Strekking van het (de) antwoord(en)
- Het horen van de aanvrager heeft geleid tot aanpassing van de aanvraag

#### 8. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **16-11-2015**
- Strekking van de vraag / vragen:
- **General questions/remarks on appendices:**
- From the appendices, particularly appendix 1 and 2, it is not always clear what parameters are measured during/after the experiment. Can you more clearly indicate this?
- From the appendices it is not clear if male or female animals are going to be used. Can you indicate this and, if appropriate, justify/substantiate the choice for a particular gender?
- Can you provide clear go/no go decision for the experiments in appendices (and, if appropriate, for appendices) and substantiate them?
- **Appendix 1:**
- In appendix 1, under **D. Replacement, reduction, refinement**, the choice for 15 animals per group seems to be arbitrary. It is not stated on which assay(s)/outcome(s) this choice is based. Can you provide a better description of the estimation/calculation of the appropriate group size?
- **Appendix 2:**
- Can you provide a better description of the estimation/calculation of the appropriate group size?
- Datum antwoord: **17-11-2015**
- Strekking van het (de) antwoord(en): **De gevraagde verduidelijkingen zijn verwerkt in het projectvoorstel en de bijlages. De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag.**

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

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

## **B. Beoordeling (adviesvraag en behandeling)**

1. Het project is vergunningplichtig (dierproeven in de zin der wet) **Ja**
2. De aanvraag betreft een **nieuwe aanvraag**
3. De DEC is competent om hierover te adviseren **Ja**
4. Vanwege betrokkenheid bij het betreffende project is een aantal DEC-leden, met het oog op onafhankelijkheid en onpartijdigheid, niet betrokken bij de advisering **n.v.t.**

## **C. Beoordeling (inhoud):**

1. Het project is:

**uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord**

2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorie(ën) is / zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling(en) **JA**
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project **JA**
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. De keuze hiervoor is voldoende wetenschappelijk onderbouwd **n.v.t.**
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd

### **Bijlage1-3: JA**

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen **vervangen**.

**Nee, de voorgestelde experimenten in de drie deelprojecten hebben een logisch verband, en kunnen alleen uitgevoerd worden in een intact organisme**



8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren is realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt.

**De aanvragers hebben ruime ervaring met het voorgestelde diermodel. De drie bijlagen zijn onderling samenhangend en go-no go beslismomenten zijn aangegeven om het aantal dieren te beperken. Het aantal dieren is waar mogelijk statistisch onderbouwd en keuzes voor (indien relevant) geslacht is beargumenteerd.**

9. 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.

**In de dierproeven wordt de research code kankeronderzoek in dieren gehanteerd. Humane eindtermen zijn gedefinieerd.**

**In zijn geheel is de aanvraag in overeenstemming met de 3V's**

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

**De achtergrond van deze projectbeschrijving is een heldere uiteenzetting van aanleiding, achtergrond en context van het voorgestelde onderzoek. Het medisch en maatschappelijk belang van de voorgestelde dierproeven is helder, huidkanker is een groot probleem en zeker melanomen zijn moeilijk behandelbaar. Het voorgestelde onderzoek kan bijdragen aan een betere behandeling.**

## **D. Ethische afweging**

**Het directe doel van dit project is om de rol van 'senescent' cellen in zowel de veroudering van de huid als in andere verouderingsziekten, zoals kanker te karakteriseren. Dit directe doel beoogt bij te dragen aan**

het uiteindelijke doel om nieuwe mogelijkheden te creëren voor de behandeling en genezing van huidkanker en andere huidverouderingsziekten. De DEC beantwoordt de centrale morele vraag of dit directe en uiteindelijke doel ethisch gerechtvaardigd is positief.

De DEC baseert zich daarbij op de volgende ethische afweging. Allereerst oordeelt zij dat het project een toetsbare eenheid is. Er worden drie parallel-onderzoeken uitgevoerd die alle volledig zijn uitgewerkt (inclusief go, no-go afwegingen: 1) inductie en detectie van senescence; 2) injectie van senescent cellen in de huid; 3) neveneffecten van melanomen en chemotherapie. Deze deelonderzoeken dragen alle bij aan de beantwoording van de hoofddoelstelling van het onderzoek. Zoals hierboven beschreven heeft de onderzoeker op navolgbare wijze aangetoond dat dierproeven met muismodellen noodzakelijk zijn. Maar binnen dat gegeven wordt op zorgvuldige wijze met de 3 V's omgegaan (zie hierboven). De mate van ongerief (gematigd) achten wij voor dit project te rechtvaardigen, mede ook gegeven de maatregelen die worden genomen om in te grijpen bij mogelijke incidenten. De kennis en ervaring van de uitvoerders wettigen ook de verwachting dat de doeleinden gehaald zullen worden. Last but not least is voor de DEC het hierboven reeds genoemde maatschappelijk belang dat een toegenomen inzicht in de rol van senescent huidkanker tot betere behandeling kan leiden een belangrijke overweging in deze ethische afweging.

## **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

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,  
9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD105002015339

**Bijlagen**

2

Datum 3 december 2015

Betreft Ontvangstbevestiging Aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 2 december 2015.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002015339. 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](http://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

### **Gegevens aanvrager**

Uw gegevens

Deelnemersnummer NVWA: 10500  
Naam instelling of organisatie: Rijksuniversiteit Groningen  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: ██████████  
KvK-nummer: 01179037  
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN  
IBAN: NL80ABNA0446049352  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

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 januari 2015  
Geplande einddatum: 31 december 2020  
Titel project: Cellular senescence in aging and cancer  
Titel niet-technische samenvatting: Cellulaire veroudering tijdens algemene veroudering en bij kanker  
Naam DEC: DEC-RUG  
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, [REDACTED] 9713 AV Groningen  
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 741,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: Groningen Datum - -



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,  
9713 AV GRONINGEN



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD105002015339

**Bijlagen**

2

Datum 3 december 2015  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 3 december 2015  
Vervaldatum: 2 januari 2016  
Factuurnummer: 15700339

Omschrijving	Bedrag
Betaling leges projectvergunning dierproeven Betreft aanvraag AVD105002015339	€ 741,00

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL28RBOS 056.99.96.066 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 20401, 2500 EK te 's Gravenhage.



**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** maandag 18 januari 2016 9:20  
**Aan:** [Redacted]  
**CC:** [Redacted]  
**Onderwerp:** RE: AVD105002015339: Aanvullende informatie

Beste [Redacted]

Dank u wel voor uw reactie. We geven het door aan de CCD en zullen daarna zo snel mogelijk de beschikking naar u toesturen.

Met vriendelijke groet,



**Centrale Commissie Dierproeven** [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 2800028**  
**E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)** (Let op: nieuw e-mail adres)

---

**Van:** [Redacted]  
**Verzonden:** vrijdag 15 januari 2016 12:54  
**Aan:** [Redacted]  
**CC:** [Redacted]  
**Onderwerp:** RE: AVD105002015339: Aanvullende informatie

Beste [Redacted]

Dank voor Uw toelichting op het voorgenomen besluit. Wij zijn akkoord met de door de CCD gestelde voorwaarde, hieronder verder gespecificeerd.

- For Section 3.4.4.2 (injection of senescent cells in the skin), we agree to use females only in case of wound healing, and an equal number of males and females in the ageing study.
- For Section 3.4.4.3 (melanoma and chemotherapy), we would like to follow your suggestion and perform a pilot study using males and females. A pilot study for the experiment has already been described in the Application. We will include in the pilot study an equal number of males and females. If the pilot study suggests that females and males have substantial differences, particularly in terms of variability, we will contact the CCD to discuss how to perform the full study. If the pilot study suggests no differences between genders, we will complete the full study using an equal number of males and females.

Mocht U nog aanvullende vragen hebben, dan horen we dit graag.

Hartelijke groet,



Van: Info-zbo [[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)]

Verzonden: vrijdag 15 januari 2016 10:15



Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: AVD105002015339: Aanvullende informatie

Geachte [REDACTED]

Op 14 januari 2016 hebben wij bericht ontvangen dat u akkoord gaat het opschorten van de behandeltermijn. Dit maakt het voor de CCD mogelijk u in de gelegenheid te stellen te reageren op het voorgenomen besluit en eventueel aanvullende informatie te verstrekken voordat de CCD haar voorgenomen besluit definitief maakt.

De CCD heeft uw aanvraag besproken en is voornemens uw aanvraag goed te keuren. De CCD wil echter wel een voorwaarde toevoegen aan de vergunning. De voorwaarde en de argumentatie hiervoor vindt u hieronder.

Vorgenomen voorwaarde:

Mannelijke als vrouwelijke dieren moeten in evenredige aantallen gebruikt worden, met uitzondering van de studies waarin wondheling bestudeerd wordt. U kunt een pilot uitvoeren waarin onderzocht wordt of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. De uitkomst van deze pilot kan voor de CCD aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken.

Onderbouwing:

U heeft aangegeven voor dierproef 3.4.4.2 alleen vrouwelijke dieren te willen gebruiken. Uw overwegingen voor het gebruik van alleen vrouwelijke dieren in deze dierproef heeft u ook in uw aanvraag toegelicht. De CCD kan zich voorstellen dat het openkrabben van de wond het wondhelingsproces zodanig verstoort dat geen conclusies getrokken kunnen worden uit proeven waarbij wondheling bestudeerd wordt indien ook mannelijke dieren gebruikt worden. De CCD is echter van mening dat u niet voldoende heeft onderbouwd waarom voor het beantwoorden van de overige vraagstellingen in dierproef 3.4.4.2 (de rol van veroudering) niet ook mannelijke dieren gebruikt kunnen worden.

U heeft daarnaast aangegeven voor dierproef 3.4.4.3 alleen mannelijke dieren te willen gebruiken. Uw overwegingen voor het gebruik van alleen mannelijke dieren in deze dierproef heeft u ook in uw aanvraag toegelicht.

De CCD is van mening dat u niet wetenschappelijk heeft aangetoond dat de menstruele cyclus in vrouwelijke dieren de ontwikkeling van melanoom in die mate beïnvloedt dat uw doelstellingen niet meer bereikt kunnen worden indien ook vrouwelijke dieren gebruikt moeten worden.

Met uitzondering van de studies waarin wondheling bestudeerd wordt, is de CCD is om bovenstaande redenen niet overtuigd van de onmogelijkheid om beide geslachten te gebruiken bij de beantwoording van de individuele

vraagstellingen.

U wordt in de gelegenheid gesteld te reageren op de voorgenomen voorwaarde. Uw reactie en eventueel aangeleverde aanvullende informatie zal de CCD in overweging nemen voordat zij haar voorgenomen besluit definitief maakt.

U wordt verzocht deze informatie uiterlijk donderdag 21 januari 2016 aan te leveren. Indien wij dan niets van u gehoord hebben, gaan wij er van uit dat u geen gebruik wilt maken van de mogelijkheid de aanvullende informatie te verstrekken en zal het voorgenomen besluit van de CCD definitief worden gemaakt.

Ik hoop u hiermee voldoende te hebben geïnformeerd. Mocht u over bovenstaande nog vragen hebben, dan horen wij dat graag.

Met vriendelijke groet,

[Redacted signature]

Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)  
(Let op: nieuw e-mail adres)

Van: [Redacted]

Verzonden: donderdag 14 januari 2016 18:32

Aan: Info-zbo

Onderwerp: Re: AVD105002015339: Aanvullende informatie

Beste [REDACTED]

Het uitstel is akkoord.

Hartelijke groeten

[REDACTED]

Verstuurd vanaf mijn iPhone

Op 14 jan. 2016 om 16:44 heeft Info-zbo <[info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)> het volgende geschreven:

Beste [REDACTED]

Wij vragen jullie inderdaad akkoord te gaan met 3 weken extra behandeltijd. Hoewel we voor deze aanvraag nog niet aan de 40 werkdagen zitten (die verloopt op 29 januari), moeten we toch jullie toestemming hiervoor vragen. Wij mogen de termijn namelijk alleen zelf opschorten als wij vragen stellen voordat er een besluit genomen wordt. In dit geval heeft de CCD de aanvraag al besproken en een voorlopig besluit genomen. We willen jullie echter graag in de gelegenheid stellen nog te reageren voordat het besluit definitief gemaakt wordt. Indien jullie reactie daar aanleiding toe geeft kan de CCD haar besluit dan nog herzien. Formeel hebben we daarom nu jullie toestemming nodig om te tijd te stoppen. Als jullie hiermee akkoord gaan en een reactie sturen zal de CCD jullie reactie in de volgende CCD vergadering bespreken. We zullen voor deze aanvraag dan uiteindelijk een aantal werkdagen over de 40 werkdagen heengaan. Als jullie op tijd kunnen reageren betekent het dus niet dat we 3 weken over de 40 werkdagen gaan, maar slechts een aantal dagen.

Zodra jullie akkoord gaan, zal ik jullie laten weten wat het voorgenomen besluit is waar we jullie vragen om op te reageren.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Van: [REDACTED]

Verzonden: donderdag 14 januari 2016 14:57

Aan: Info-zbo

Onderwerp: RE: AVD105002015339: Aanvullende informatie

Beste [REDACTED]

Even voor de zekerheid: jullie vragen of we akkoord zijn met de extra 3 weken behandeltijd om de door jullie gestelde vragen te beantwoorden, toch?

Groeten

[REDACTED]

Van: Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]

Verzonden: donderdag 14 januari 2016 14:49

Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: RE: AVD105002015339: Aanvullende informatie

Geachte [REDACTED]

Wij hebben u op woensdag 12 januari 2016 onderstaande e-mail gestuurd. In deze e-mail hebben wij echter geen reactietermijn genoemd. U wordt verzocht ons uiterlijk vrijdag 15-1-2016 te laten weten of u akkoord gaat met het opschorten van de termijn.

Indien wij op 15-1-2016 niets van u gehoord hebben, gaan wij er van uit dat u geen gebruik wilt maken van de door de CCD geboden mogelijkheid te reageren op het voorgenomen besluit.

Wij wachten uw reactie af.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

(Let op: nieuw e-mail adres)

Van: Info-zbo

Verzonden: woensdag 13 januari 2016 14:07

Aan: [REDACTED]

CC: [REDACTED]

Onderwerp: AVD105002015339: Aanvullende informatie

Geachte [REDACTED]

De CCD heeft uw aanvraag besproken. Voordat zij een besluit neemt over uw aanvraag, wil zij u in de gelegenheid stellen te reageren op het voorgenomen besluit. Om u hiervoor de gelegenheid te kunnen geven en uw aanvraag vervolgens opnieuw tijdens de CCD vergadering te kunnen bespreken, dienen wij de behandeltermijn echter op te schorten.

Indien u gebruik wilt maken van de mogelijkheid te reageren op het voorgenomen besluit, verzoeken wij u in te stemmen met het opschorten van de behandeltermijn met maximaal 3 weken.

Indien u akkoord gaat met het opschorten van de behandeltermijn, zullen wij u daarna verder informeren over het voorgenomen besluit.

Wij wachten uw reactie af.

Met vriendelijke groet,



Centrale Commissie Dierproeven

[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

.....  
T: 0900 2800028

E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)

(Let op: nieuw e-mail adres)

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

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

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

worden voor een incomplete aankomst of vertraging van dit verzonden bericht.

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

---

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

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

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** donderdag 7 januari 2016 16:20  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**Onderwerp:** RE: Aanvraag projectvergunning AVD105002015339: aanvullende informatie

Beste [REDACTED]

De ongerief classificatie voor de aging studie is door de onderzoeker onterecht als terminaal (non-recovery) bestempeld. Dit zou mild ongerief moeten zijn. Dit is er doorheen geglipt bij de beoordeling. Voor de UV studie zou ook mild ongerief gelden. Door de DEC is tevens ruggenspraak gehouden met de onderzoekers die bovenstaande conclusies onderschrijven. De DEC zal er beter op letten

---

**From:** Info-zbo [mailto:info@zbo-ccd.nl]  
**Sent:** donderdag 7 januari 2016 10:59  
**To:** [REDACTED]  
**Subject:** RE: Aanvraag projectvergunning AVD105002015339: aanvullende informatie

Beste meneer [REDACTED]

Deze vragen zijn niet naar de aanvrager gestuurd, omdat wij in dit geval graag specifiek van de DEC wilde weten waarom zij de ongeriefsclassificatie zoals beschreven in de aanvraag als correct heeft ingeschat. Wij ontvangen graag zo snel mogelijk uw antwoord op deze vragen zodat de behandeling van deze aanvraag geen vertraging oploopt.

Met vriendelijke groet,

Centrale Commissie Dierproeven [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 2800028**  
**E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)** (Let op: nieuw e-mail adres)

---

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** donderdag 7 januari 2016 10:42  
**Aan:** 'Info-zbo'  
**Onderwerp:** Re: Aanvraag projectvergunning AVD105002015339: aanvullende informatie

Beste [REDACTED]

Uw vragen in onderstaande mail van 24 dec. heb ik afgelopen maandag van het secretariaat doorgestuurd gekregen (i.v.m. de tussenliggende feestdagen en kerstvakantie is dit tot het nieuwe jaar blijven liggen).



Het is mij onduidelijk of deze vragen ook richting onderzoeker zijn gegaan (lijkt in dit geval wel opportuun).

U wilde uiterlijk dinsdag 5 januari een antwoord, maar dat lukte duidelijk niet (mede veroorzaakt door de tussenliggende feestdagen en kerstvakantie).

Ik zal de vragen doorsturen naar de DEC.

Gr.

██████████

██████████████████

---

**Van:** Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]

**Verzonden:** donderdag 24 december 2015 11:44

**Aan:** ██████████

**Onderwerp:** Aanvraag projectvergunning AVD105002015339: aanvullende informatie

Geachte DEC,

Wij hebben een aanvraag voor een projectvergunning in behandeling waar u ons advies over heeft gegeven. Het gaat om het project "Cellular senescence in aging and cancer" met aanvraagnummer AVD105002015339. Wij hebben nog twee vragen over de ongeriefsclassificatie in dierproef 3.4.4.1.

In dierproef 3.4.4.1 is de ongeriefsclassificatie voor de verouderingsstudie ingeschat als terminaal. Wij zijn van mening dat de ongeriefsclassificatie voor de verouderingsstudie (dierproef 3.4.4.1) niet als terminaal kan worden ingeschat, aangezien dieren vanaf een leeftijd van 12 maanden gedurende vijf dagen dagelijks geïnjecteerd worden met Ganciclovir . Dit wordt elke 2 maanden herhaald. Daarnaast worden er huidbiopsies genomen. Dit past niet bij de definitie van 'terminaal'. Indien u van mening bent dat het ongerief toch als 'terminaal' zou moeten worden ingeschat, verzoeken wij u dit toe te lichten. Indien u het met ons eens bent dat dit niet de juiste inschatting van het ongerief is, verzoeken wij u ons te laten weten hoe u het dan ongerief inschat.

De aanvrager heeft daarnaast de ongeriefsclassificatie voor de UV bestralingsstudie niet weergegeven. Kunt u aangeven hoe u de ongeriefsclassificatie voor deze studie inschat?

Aangezien de CCD deze aanvraag graag in de eerstkomende vergadering wil behandelen, zouden wij uw toelichting graag uiterlijk dinsdag 5 januari 2016 ontvangen.

Bij voorbaat hartelijk dank,

Met vriendelijke groet,

██████████████████

**Centrale Commissie Dierproeven** [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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

**T: 0900 2800028**

**E: [info@zbo-ccd.nl](mailto:info@zbo-ccd.nl)** (Let op: nieuw e-mail adres)

---

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

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

---

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

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

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan 1,  
9713 AV Groningen

**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**  
AVD105002015339

**Uw referentie**

**Bijlagen**  
1

Datum 19 januari 2016

Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte

Op 02 december 2015 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project 'Cellular senescence in aging and cancer' met aanvraagnummer AVD105002015339. 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).

Uw aanvraag omvat drie verschillende bijlagen dierproeven. De ongeriefsclassificaties voor twee studies beschreven in bijlage 3.4.4.1 'Induction and detection of senescence' zijn in de vergunning, na overleg met de DEC, aangepast. Wij zijn van mening dat het ongerief van de dieren in de verouderingsstudie als licht zou moeten worden ingeschat in plaats van terminaal. Het ongerief van de dieren tijdens de UV bestralingsstudie zou ook als licht moeten worden ingeschat. Deze inschatting ontbrak in uw aanvraag.

Aan deze vergunning zijn de voorwaarden verbonden zoals genoemd in de vergunning en hieronder toegelicht.

1) In artikel 1d juncto artikel 10 lid 2 aanhef en onder sub a Wod is opgenomen dat, indien er verschillende methoden bestaan om een dierproef te verrichten, wordt gekozen voor de dierproef waarbij een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. Onderstaande voorwaarde ziet toe op het verminderen van het aantal in voorraad gedode dieren. Bovendien heeft de CCD vast uitvoeringsbeleid opgesteld waarin dit ethische aspect is opgenomen.

U heeft in uw aanvraag aangegeven voor bijlage 3.4.4.2 alleen vrouwelijke dieren te willen gebruiken. Uw overwegingen voor het gebruik van alleen vrouwelijke dieren in deze dierproef heeft u ook in uw aanvraag toegelicht. Wij kunnen ons voorstellen dat het openkrabben van de wond het wondhelingsproces zodanig verstoort dat geen conclusies getrokken kunnen worden uit proeven waarbij wondheling bestudeerd wordt indien ook mannelijke dieren gebruikt worden. Wij zijn echter van mening dat u niet voldoende heeft onderbouwd waarom voor het beantwoorden van de overige vraagstellingen in dierproef 3.4.4.2 niet ook mannelijke dieren gebruikt kunnen worden. U heeft daarnaast aangegeven voor dierproef 3.4.4.3 alleen mannelijke dieren te willen gebruiken. Uw overwegingen voor het gebruik van

alleen mannelijke dieren in deze dierproef heeft u ook in uw aanvraag toegelicht. Wij zijn van mening dat u niet wetenschappelijk heeft aangetoond dat de menstruele cyclus in vrouwelijke dieren de ontwikkeling van melanoom in die mate beïnvloedt dat uw doelstellingen niet meer bereikt kunnen worden indien ook vrouwelijke dieren gebruikt moeten worden.

Met uitzondering van de studies waarin wondheling bestudeerd wordt, zijn wij om bovenstaande redenen niet overtuigd van de onmogelijkheid om beide geslachten te gebruiken bij de beantwoording van de individuele vraagstellingen. Mannelijke als vrouwelijke dieren moeten daarom in evenredige aantallen gebruikt worden, met uitzondering van de studies waarin wondheling bestudeerd wordt. U kunt een pilot uitvoeren waarin onderzocht wordt of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. De uitkomst van deze pilot kan voor ons aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken. Deze voorwaarde is toegevoegd om het aantal in voorraad gedode dieren te beperken.

Op 15 januari 2016 hebben wij u in de gelegenheid gesteld te reageren op ons voorgenomen besluit. U heeft aangegeven akkoord te gaan met de voorwaarde zoals hierboven toegelicht en in de vergunning beschreven.

2) Hierbij geldt de algemene voorwaarde zoals genoemd in de vergunning.

U kunt met uw project 'Cellular senescence in aging and cancer' starten. De vergunning wordt afgegeven van 19 januari 2016 tot en met 31 december 2020.

#### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies gevoegd van de Dierexperimentencommissie DEC-RUG d.d. 02 december 2015. De DEC heeft ons op 07 januari 2016 aanvullend geadviseerd naar aanleiding van een vraag over de ongeriefclassificaties in bijlage 3.4.4.1. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a lid 3 van de wet. We nemen het advies van de Dierexperimentencommissie grotendeels over met uitzondering van de afwijkingen zoals hierboven gemotiveerd. 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 het colofon.

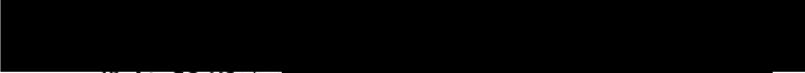
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel 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](http://www.centralecommissiedierproeven.nl). Of neem telefonisch contact met ons op: 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

De Centrale Commissie Dierproeven

  
Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

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

Bijlagen

- Vergunning

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



## Projectvergunning

### gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan  
Naam: Rijksuniversiteit Groningen  
Postbus: A. Deusinglaan 1  
Postcode en woonplaats: 9713 AV Groningen  
Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 19 januari 2016 tot en met 31 december 2020, voor het project 'Cellular senescence in aging and cancer' met aanvraagnummer AVD105002015339, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. Hierbij is afgeweken van het DEC-advies, omdat wij van mening zijn dat voor het beantwoorden van de onderzoeksvragen, met uitzondering van de studies waarin wondheling bestudeerd wordt, zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt kunnen worden. In aanvulling op het DEC advies is een algemene voorwaarde opgenomen in de vergunning. In overleg met de DEC zijn de ongeriefsclassificaties in bijlage 3.4.4.1 "Induction and detection of senescence" aangepast.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Group leader.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 02 december 2015
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 02 december 2015;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 02 december 2015;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen per digitale indiening op 02 december 2015;
  - d. Reactie van aanvrager op voorgenomen besluit, zoals ontvangen per digitale indiening op 15 januari 2016;
  - e. Aanvullend advies van Dierexperimentencommissie, zoals ontvangen per digitale indiening op 07 januari 2016

### Dierproeven

Naam dierproef	Diersoort	Aantal dieren	Ernst
3.4.4.1 Induction and detection of senescence	Muizen	570	Wondgenezing: Licht Chemotherapie: Matig UV bestraling: Licht Veroudering: Licht
3.4.4.2 Injection of senescent cells in the skin	Muizen	480	Licht
3.4.4.3 Melanoma and chemotherapy side effects	Muizen	360	Licht

### Voorwaarden

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

- 1) Mannelijke als vrouwelijke dieren moeten in evenredige aantallen gebruikt worden, met uitzondering van de studies waarin wondheling bestudeerd wordt. De aanvrager kan een pilot uitvoeren waarin onderzocht wordt of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. De uitkomst van deze pilot kan voor de CCD aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken.

### Algemene voorwaarde

- 2) In artikel 10, lid 1a 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

**Datum**  
19 januari 2016  
**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD105002015339

worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning. Indien bovenstaande zich voordoet dient aanvrager dit in overleg met de IvD te melden bij de CCD. De CCD kan in een dergelijke situatie aan de vergunning nieuwe voorwaarden verbinden en gestelde voorwaarden wijzigen of intrekken.

## **Weergave wet- en regelgeving**

### **Dit project en wijzigingen**

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

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

### **Verzorging**

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

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

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

### **Pijnbestrijding en verdoving**

In artikel 13 van de wet staat dat een dierproef onder algehele of plaatselijke verdoving wordt uitgevoerd tenzij dat niet mogelijk is, dan wel bij het verrichten van een dierproef worden pijnstillers toegediend of andere goede methoden gebruikt die de pijn, het lijden, de angst of de blijvende schade bij het dier tot een minimum beperken. Een dierproef die bij het dier gepaard gaat met zwaar letsel dat hevige pijn kan veroorzaken, wordt niet zonder verdoving uitgevoerd. Hierbij wordt afgewogen of het toedienen van verdoving voor het dier traumatischer is dan de dierproef zelf en het toedienen van verdoving 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 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



**Datum**  
19 januari 2016  
**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD105002015339

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.

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** woensdag 20 januari 2016 9:47  
**Aan:** 'secrdec.umcg@umcg.nl'  
**Onderwerp:** Terugkoppeling aanvraag projectvergunning AVD105002015339

Geachte DEC,

Op 02 december 2015 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Cellular senescence in aging and cancer' met aanvraagnummer AVD105002015339.

De CCD heeft besloten de vergunning te verlenen. De CCD heeft wel een aanvullende voorwaarde aan de vergunning verbonden. De aanvrager en verantwoordelijk onderzoeker zijn hierover ingelicht.

Langs deze weg willen wij u graag informeren over de door de CCD gestelde voorwaarde aan de projectvergunning.

De vergunning wordt verleend onder de volgende voorwaarden:

Mannelijke als vrouwelijke dieren moeten in evenredige aantallen gebruikt worden, met uitzondering van de studies waarin wondheling bestudeerd wordt. De aanvrager kan een pilot uitvoeren waarin onderzocht wordt of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. De uitkomst van deze pilot kan voor de CCD aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken.

De reden voor deze voorwaarde is als volgt:

In artikel 1d juncto artikel 10 lid 2 aanhef en onder sub a Wod is opgenomen dat, indien er verschillende methoden bestaan om een dierproef te verrichten, wordt gekozen voor de dierproef waarbij een zo gering mogelijk aantal dieren wordt gebruikt. Onderstaande voorwaarde ziet toe op het verminderen van het aantal in voorraad gedode dieren. Bovendien heeft de CCD vast uitvoeringsbeleid opgesteld waarin dit ethische aspect is opgenomen.

De aanvrager heeft in de aanvraag aangegeven voor bijlage 3.4.4.2 alleen vrouwelijke dieren te willen gebruiken. De overwegingen voor het gebruik van alleen vrouwelijke dieren in deze dierproef heeft de aanvrager ook in uw aanvraag toegelicht. Wij kunnen ons voorstellen dat het openkrabben van de wond het wondhelingsproces zodanig verstoort dat geen conclusies getrokken kunnen worden uit proeven waarbij wondheling bestudeerd wordt indien ook mannelijke dieren gebruikt worden. Wij zijn echter van mening dat de aanvrager niet voldoende heeft onderbouwd waarom voor het beantwoorden van de overige vraagstellingen in dierproef 3.4.4.2 niet ook mannelijke dieren gebruikt kunnen worden. De aanvrager heeft daarnaast aangegeven voor dierproef 3.4.4.3 alleen mannelijke dieren te willen gebruiken. De overwegingen voor het gebruik van alleen mannelijke dieren in deze dierproef heeft de aanvrager ook in de aanvraag toegelicht. Wij zijn van mening dat de aanvrager niet wetenschappelijk heeft aangetoond dat de menstruele cyclus in vrouwelijke dieren de ontwikkeling van melanoom in die mate beïnvloedt dat de doelstellingen niet meer bereikt kunnen worden indien ook vrouwelijke dieren gebruikt moeten worden.

Met uitzondering van de studies waarin wondheling bestudeerd wordt, zijn wij om bovenstaande redenen niet overtuigd van de onmogelijkheid om beide geslachten te gebruiken bij de beantwoording van de individuele vraagstellingen. Mannelijke als vrouwelijke dieren moeten daarom in evenredige aantallen gebruikt worden, met uitzondering van de studies waarin wondheling bestudeerd wordt. De aanvrager een pilot uitvoeren waarin onderzocht wordt of het gebruik van beide geslachten mogelijk is. De uitkomst van deze pilot kan voor ons aanleiding zijn om bovenstaande voorwaarde van gelijk gebruik van beide geslachten te wijzigen of in te trekken. Deze voorwaarde is toegevoegd om het aantal in voorraad gedode dieren te beperken.

Op 15 januari 2016 hebben wij de aanvrager in de gelegenheid gesteld te reageren op ons voorgenomen besluit. De aanvrager heeft aangegeven akkoord te gaan met de voorwaarde zoals hierboven toegelicht..

Daarnaast hebben wij na overleg met u de ongeriefsclassificaties in bijlage 3.4.4.1 aangepast.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

Met vriendelijke groet,

████████████████████

**Centrale Commissie Dierproeven** [www.zbo-ccd.nl](http://www.zbo-ccd.nl)

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

**T: 0900 2800028**

**E: [ZBO-CCD@minez.nl](mailto:ZBO-CCD@minez.nl)**