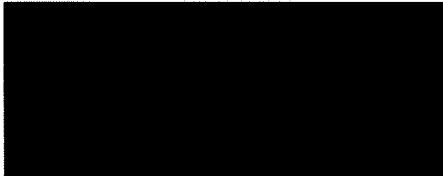




## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 93118, 2509 AC Den Haag



### Centrale Commissie Dierproeven

Postbus 93118  
2509 AC Den Haag  
[www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)

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


**Onze referentie**  
B.2.16.031

**Uw referentie**  
2016/113

**Briefkenmerk**  
CCD-2018-121

Datum **16 JUL 2018**  
Betreft Beslissing op bezwaar B.2.16.031 (W16-16S)

Geachte heer 

Bij brief van 11 november 2016, ontvangen op 15 november 2016, heeft u, namens uw cliënte  een bezwaarschrift (met kenmerk 2016/113) ingediend tegen het besluit van de Centrale Commissie Dierproeven (hierna: CCD) van 11 oktober 2016 met kenmerk W16-16S.

#### Verloop van de procedure

- Op 4 juli 2016 ontvingen wij per e-mail het verzoek op basis van de Wet openbaarheid van bestuur (hierna: Wob) van uw cliënte om toezending van documenten die betrekking hebben op een zevental verschillende vergunningen. Voor een opsomming van de vergunningen wordt verwezen naar het verzoek;
- Bij besluit van 11 oktober 2016 is op dit Wob-verzoek beslist;
- Vervolgens ontvingen wij op 15 november 2016 uw bezwaarschrift, gericht tegen voornoemd besluit;
- De ontvangst van uw bezwaarschrift hebben wij bij brief van 17 november 2016 bevestigd;
- Op 24 november 2016 is het Wob-besluit tezamen met de bijbehorende documenten op de website van de CCD geplaatst;
- Op 28 maart 2017 hebben wij per e-mail aangekondigd dat wij in de onderhavige zaak een hoorzitting met u willen plannen. Voorts hebben wij u in deze e-mail verzocht om uw gronden van bezwaar (eventueel) aan te vullen, nu de documenten van Wob-besluit W16-16S sinds 24 november 2016 op de website van de CCD staan gepubliceerd. Wij hebben u voor de eventuele aanvulling van de gronden een termijn tot 11 april 2017 verleend. Van deze mogelijkheid heeft u geen gebruik gemaakt;

- Bij brief van 2 mei 2017 hebben wij u de uitnodiging voor de hoorzitting op 16 mei 2017 gestuurd. Daarnaast hebben wij op die datum de geanonimiseerde zienswijzen van derde belanghebbenden toegestuurd;
- Voorts heeft op 16 mei 2017 de hoorzitting met u plaatsgevonden. Het verslag van de hoorzitting is als bijlage bij dit besluit gevoegd. Tijdens de hoorzitting heeft u een groot aantal nieuwe bezwaargronden aangevoerd. Gesteld wordt dat met het zodanig laat kenbaar maken van nieuwe gronden van bezwaar derde belanghebbenden worden belemmerd om daarop adequaat te reageren, waardoor de goede voortgang van de procedure is belemmerd;
- Op 22 mei 2017 heeft de telefonische hoorzitting met een van de derde belanghebbenden plaatsgevonden. Op verzoek van deze belanghebbende is, mede vanwege het bespreken van vertrouwelijke, concurrentiegevoelige gegevens, afzonderlijk gehoord. De derde belanghebbende heeft tevens verzocht om met toepassing van artikel 7:6 lid 4 Algemene wet bestuursrecht (hierna: Awb) het verslag van de hoorzitting niet aan u toe te sturen. Nu het verslag van de hoorzitting echter geen concurrentiegevoelige gegevens bevat, acht de CCD geheimhouding om gewichtige redenen niet noodzakelijk. Op 26 juni 2018 hebben wij u het verslag per e-mail toegestuurd;
- Overige derde belanghebbenden hebben aangegeven niet gehoord te willen worden in deze zaak.

### **Beslissing**

Het bestuur van de CCD verklaart het bezwaar namens uw cliënte gedeeltelijk gegrond en gedeeltelijk ongegrond. Dit betekent dat het besluit van 11 oktober 2016 gedeeltelijk wordt herroepen en gedeeltelijk blijft gehandhaafd. Hierna kunt u lezen op grond van welke overwegingen het bestuur van de CCD tot deze beslissing is gekomen.

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

Het bezwaar richt zich tegen het besluit van 11 oktober 2016. Het bezwaarschrift is ingediend binnen zes weken na bekendmaking van het besluit. Het bezwaar is derhalve tijdig ingediend. Voldaan is ook aan de overige door de Awb gestelde eisen, zodat het bezwaarschrift ontvankelijk is.

### **Derde belanghebbenden**

Aan de derde belanghebbenden is gevraagd om gehoord te willen worden. Eén derde belanghebbende heeft hiervan – zoals hiervoor aangegeven – gebruik gemaakt. Voor het overige zijn de zienswijzen van de derde belanghebbenden uit de primaire fase u vóór de hoorzitting, anoniem, maar verbonden aan het NTS-nummer, verstrekt.

### **Bezwaren**

Hieronder worden uw bezwaargronden toegelicht.

Uw bezwaren 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. 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 – zijn niet inzichtelijk gemaakt. De zienswijzen van derde belanghebbenden worden genoemd, maar het oordeel van de CCD hierover ontbreekt (**bezwaar 2**).

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. Bovendien hebben betrokkenen volgens u op geen enkele wijze inzichtelijk gemaakt dat zij in de afgelopen jaren zijn geconfronteerd met ontoelaatbare bejegeningen van (dierenrechten)activisten (**bezwaar 3**).

Voor wat betreft vergunning 2016460 heeft u aangegeven dat wordt bestreden dat de geweigerde informatie op grond van artikel 10 lid 2 sub c van de Wob uit vertrouwelijk overlegde bedrijfs- en fabricagegegevens bestaat. Daarnaast wordt in deze vergunning informatie geweigerd, omdat concurrenten hiermee een octrooiaanvraag kunnen initiëren. Dit is volgens u geen onevenredige benadeling en valt onder het risico van de vergunninghouder (**bezwaar 4**).

U heeft in uw bezwaarschrift eveneens aangegeven dat de stelling dat bij openbaarmaking gegevens niet meer beschermd worden door intellectuele eigendomsrechten geen hout snijdt. Ook het argument dat er nog patent moet worden aangevraagd, houdt volgens u geen stand. Onderzoeksstrategieën zijn naar uw mening bovendien niet patentwaardig (**bezwaar 5**).

Tijdens de hoorzitting heeft u aanvullend nog een aantal gronden van bezwaar genoemd. In vergunning 2016460 zijn passages in de 'animal procedure' en de wijze van doden ten onrechte geweigerd. Deze bezwaargrond zal onder **bezwaar 4** worden behandeld.

Ook in de vergunningen 2016462, 2016464, 2016465, 2016466 en 2016467 zijn volgens u ten onrechte passages geweigerd. In vergunning 2016462 worden de mate van ongerief en het humane eindpunt geweigerd. In vergunning 2016467 worden bepaalde cellen, omschrijvingen van dieren, de mate van ongerief en het nummer van een DEC-aanvraag ten onrechte geweigerd (**bezwaar 6**).

Tenslotte wordt door u verzocht om heroverweging van het besluit en om alsnog alle openbare informatie te verstrekken. Tevens wordt verzocht om toepassing te geven aan artikel 7:15 Awb.

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

Op grond van het onderstaande slaagt deze grond niet. De motivering uit het bestreden besluit wordt aangevuld, maar dit leidt niet tot verdergaande openbaarmaking.

In het bezwaarschrift heeft u aangegeven dat adviezen van de CCD ten onrechte volledig op grond van artikel 11 lid 1 van de Wob worden geweigerd. Bestreden wordt dat de adviezen volledig uit persoonlijke beleidsopvattingen bestaan. De data van de vergaderingen zijn geen persoonlijke beleidsopvattingen ten behoeve van intern beraad.

Tijdens de hoorzitting op 16 mei 2017 heeft u aangegeven dat het onderhavige Wob-verzoek ziet op de correspondentie tussen de DEC's en de CCD en de vergunninghouders en de CCD. Hiermee heeft u het Wob-verzoek ingeperkt, waardoor de bovenstaande bezwaargrond komt te vervallen.

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

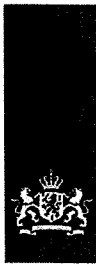
Aangaande het advies van het secretariaat van de CCD aan het bestuur van de CCD kan worden aangegeven dat dit is opgesteld ten behoeve van overleg en meningsvorming over een bestuurlijke aangelegenheid, zodat het is opgesteld ten behoeve van intern beraad. Bovendien bevat het advies meningen, voorstellen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

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

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

In het onderhavige geval betreft het een beperkte en aanwijsbare groep ambtenaren. De CCD acht het niet van belang voor een goede en democratische bestuursvoering indien standpunten en adviezen van ambtenaren zelfstandig worden betrokken in de publieke discussie. De CCD ziet dan ook geen aanleiding





om met toepassing van artikel 11 lid 2 van de Wob in niet tot personen herleidbare vorm informatie te verstrekken over deze beleidsopvattingen.

Uitzonderingen op het bovenstaande vormen de data van de vergaderingen van de CCD die in de ambtelijke adviezen zijn opgenomen. Deze data staan in de verslagen van de vergaderingen van de CCD vermeld, welke op de website van de CCD – [www.centralecommissiedierproeven.nl](http://www.centralecommissiedierproeven.nl) – staan gepubliceerd. Door de zoekterm 'verslag' in te voeren, zijn deze verslagen eenvoudig te achterhalen. Uit de verslagen volgt wanneer welke aanvraag – onder de vermelding van het NTS-nummer – in de vergadering is besproken. Op deze wijze is deze informatie reeds openbaar.

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

Op basis van het hiernavolgende slaagt deze grond deels.

Bij het bestreden 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) is (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 mee 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 hiernaar herleidbare informatie zijn geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub e en sub g van de Wob. In het besluit is tevens opgenomen in welke gevallen informatie is geweigerd op grond van het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling (artikel 10 lid 2 sub g van de Wob). Dit sluit aan bij de informatie zoals opgenomen in de kruisjestabel. Uit de kruisjestabel en uit het besluit volgt dat het advies van het secretariaat van de CCD aan het bestuur van de CCD volledig is geweigerd op grond van artikel 11 van de Wob.

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

De openbaar gemaakte documenten zijn bovendien bij iedere vergunning nagenoeg 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 van 2 september 2015, ECLI:NL:RVS:2015:2779.

Voor wat betreft het weigeren van gegevens op grond van artikel 10 lid 2 sub e van de Wob zijn in het bestreden besluit de zienswijzen van derde belanghebbenden opgenomen en daarnaast is het oordeel van de CCD hierover opgenomen. Aangaande weigeringen op grond van artikel 10 lid 1 sub c en artikel 10 lid 2 sub g van de Wob zijn de zienswijzen van de derde belanghebbenden opgenomen, maar ontbreekt voor een gedeelte het oordeel van de CCD. Dit

laatste punt zal op meerdere plaatsen in dit besluit – met name onder **bezwaar 4, 5 en 6** – worden behandeld.

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

Op basis van het hiernavolgende slaagt deze grond niet. De motivering uit het bestreden besluit wordt aangevuld, maar dit leidt niet tot verdergaande openbaarmaking.

In dit kader zoekt de CCD aansluiting bij de uitspraak van de Afdeling van 31 januari 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:321). Uit deze uitspraak volgt dat het belang van eerbiediging van de persoonlijke levenssfeer zich verzet tegen openbaarmaking van namen van medewerkers die niet wegens hun functie in de openbaarheid treden, tenzij de indiener van het Wob-verzoek aannemelijk heeft gemaakt dat het belang van openbaarheid in een concreet geval zwaarder weegt.

Voor de CCD staat voldoende vast dat op geen enkele wijze aannemelijk is gemaakt dat het belang van openbaarheid in een concreet geval zwaarder weegt. De CCD is van oordeel dat de aangehaalde uitspraak van toepassing is op zowel de namen van medewerkers van het secretariaat van de CCD als op namen van medewerkers van de vergunninghouders en/of de DEC's. Aangezien zowel in het bezwaarschrift als tijdens de hoorzitting op geen enkele wijze aannemelijk is gemaakt dat het belang van openbaarmaking zwaarder weegt dan het belang van het weigeren van deze informatie, ziet de CCD geen aanleiding deze informatie te openbaren.

Ten aanzien van de dreiging van dierenrechtenactivisme wordt opgemerkt dat ook om deze reden de betreffende informatie geweigerd blijft. In andere bezwaarschriften (bijvoorbeeld met uw kenmerken 2016/036, 2017/003, 2017/006 en 2017/029) heeft u deze bezwaargrond aangevuld en heeft u aangegeven dat de motivering van de Afdeling in de uitspraak van 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680) uitsluitend wordt gebaseerd op het feit dat onweersproken zou zijn gesteld dat betrokken vergunninghouders in de afgelopen jaren te maken hebben gehad met bedreigingen en intimidatie en dat de dreiging van dierenrechtenactivisme nog actueel is, de opmerking over een mogelijke heropleving van dierenrechtenextremisme in een rapportage van de NCTV en dat dierenrechtenextremisme nog wordt genoemd in het jaarverslag van de AIVD. Daarnaast heeft u aangegeven dat de vergunninghouders geen van allen zijn geconfronteerd met ontoelaatbare acties van dierenrechtenextremisten, dat de NCTV geen kennis heeft van recente acties van dierenrechtenextremisten en dat de AIVD kennelijk geen dreiging van dierenrechtenextremisme meer ziet.

Het bovenstaande is door u tevens aangevoerd in een hoger beroepsprocedure, welke uiteindelijk heeft geleid tot de uitspraak van de Afdeling van 14 februari 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:492). In deze uitspraak verwijst de Afdeling naar de recente uitspraken van 7 juni 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:1498), 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952) en 15 maart 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:680), waarbij de Afdeling heeft overwogen dat de vrees voor dierenrechtenactivisme gerechtvaardigd is. De Afdeling ziet naar aanleiding van deze motivering geen aanleiding om thans tot een ander oordeel te komen. Het enkele feit dat in het jaarverslag van de AIVD over 2016 geen aparte signalering over



dierenrechtenextremisme is opgenomen, is onvoldoende om thans tot een ander oordeel te komen dan in voormelde uitspraak.

Het voornoemde is nogmaals bevestigd in de zeer recente uitspraak van de Afdeling van 18 april 2018 (ECLI:NL:RVS:2018:1282), waarbij aanvullend is aangegeven dat derde belanghebbenden geen concrete tot hen gerichte dreiging van dierenrechtenactivisme aannemelijk hoeven te maken. Ook uit de uitspraken van de rechtbank Gelderland van 5 april 2018 (ECLI:NL:RBGEL:2018:1532) en van de rechtbank Den Haag van 20 februari 2018 (ECLI:NL:RBDHA:2018:1766) volgt, dat vanwege de gerechtvaardigde vrees voor dreiging van dierenrechtenactivisme, het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling zwaarder dient te wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van de gevraagde gegevens.

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

Op basis van het onderstaande slaagt deze grond deels.

Voor wat betreft vergunning 2016460 heeft u in uw bezwaarschrift aangegeven dat u bestrijdt dat de geweigerde informatie op grond van artikel 10 lid 1 sub c van de Wob uit vertrouwelijk overlegde bedrijfs- en fabricagegegevens bestaat. Daarnaast wordt in deze vergunning informatie geweigerd, omdat concurrenten hiermee een octrooiaanvraag kunnen initiëren. Dit is volgens u geen onevenredige benadeling en valt onder het risico van de vergunninghouder. Tijdens de hoorzitting heeft u voorts aangegeven dat volgens u ten onrechte passages in de 'animal procedure' en in de wijze van doden zijn geweigerd.

Met betrekking tot deze vergunning is in de bijbehorende inventaris aangegeven dat in de documenten 1, 2, 4, 5, 6, 7 en 9 gegevens zijn geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. In de documenten 1, 7 en 9 betreft het namen, locatiegegevens, gegevens die herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen. De CCD is van mening dat deze gegevens terecht zijn geweigerd. In de documenten 2, 4, 5 en 6 gaat het om zowel bedrijfs- en fabricagegegevens als om concurrentiegevoelige informatie.

U geeft in uw bezwaarschrift weliswaar aan dat u bestrijdt dat de geweigerde gegevens in vergunning 2016460 vertrouwelijk overlegde bedrijfs- en fabricagegegevens betreffen, maar u heeft niet aangegeven waarom u dit bestrijdt. Zoals uit het bestreden besluit blijkt, is de CCD van oordeel dat de documenten 2, 4, 5 en 6 wel degelijk bedrijfs- en fabricagegegevens bevatten. De CCD verwijst hiervoor mede naar de uitspraak van de rechtbank Den Haag van 5 april 2018 (ECLI:NL:RBDHA:2018:4222).

Uit het bestreden besluit blijkt, dat het in deze documenten om de ontwikkeling en opzet van een hypothese gaat, waarin het onderzoeken van bepaalde ingrediënten en/of een combinatie van ingrediënten in een diermodel centraal staat. De CCD is van oordeel dat de hypothese, de gekozen onderzoeksmethode en de daarmee samenhangende humane doelgroepopulatie inzicht geven in de onderzoeksstrategie. Bovendien geeft het inzicht in de huidige en toekomstige afzetmarkt en in de huidige en toekomstige markt voor grondstofleveranciers. De CCD kan de belanghebbende volgen in haar bevinding dat het in de markt waar

belanghebbende zich bevindt niet onmogelijk is dat concurrenten elkaar proberen te blokkeren door exclusiviteitsafspraken te maken met toeleveranciers.

In document 2 zijn voorts onder andere researchvragen opgesteld, welke van essentieel belang zijn voor het verloop en de uitkomsten van het onderzoek en welke – al dan niet inclusief antwoord – telkens terugkeren in de documenten. In document 4 worden verschillende fasen, experimenten en stappen in het onderzoek uitgebreid beschreven en dit leidt volgens de CCD tot een gedetailleerd inzicht in de inrichting van het productieproces en de gevolgde productieprocedures. Document 5 is een nadere uitwerking van hetgeen in document 2 en 4 is aangegeven. Er worden doelen, te nemen stappen en te verwachten uitkomsten beschreven. Deze gegevens zijn te beschouwen als concurrentiegevoelig en blijven derhalve geweigerd. In document 6 staat voor een groot gedeelte dezelfde informatie als in document 2 en 4. De geweigerde gegevens zijn dan ook dezelfde gegevens die in eerdere documenten zijn geweigerd. Adviezen en conclusies worden niet geweigerd.

Zoals uit het voorgaande blijkt, betreffen de geweigerde gegevens informatie over de inrichting van het productieproces, de omvang en frequentie van de productie, de gevolgde productieprocedures, de inrichting van de productiefaciliteiten en inzicht in de afnemers en toeleveranciers van de vergunninghouder. Uit vaste jurisprudentie volgt dat sprake is van bedrijfs- en fabricagegegevens nu uit deze gegevens wetenswaardigheden kunnen worden gelezen of afgeleid met betrekking tot de technische bedrijfsvoering of het productieproces dan wel met betrekking tot de afzet van de producten of de kring van afnemers en leveranciers.

Tijdens de hoorzitting heeft u voorts aangegeven dat volgens u ten onrechte passages in de 'animal procedure' en in de wijze van doden zijn geweigerd. Voor wat betreft de 'animal procedure' kan worden aangegeven dat hierin een uitwerking is opgenomen van hetgeen in het projectvoorstel is beschreven. Hiervoor is reeds op de weigeringen in dit document ingegaan. Deze weigeringen zijn ook van toepassing op de informatie in de 'animal procedure'.

Voor wat betreft de wijze van doden kan worden aangegeven dat weliswaar een passage in dit onderdeel is geweigerd, maar dat dit niet specifiek de wijze van doden betreft. Het is een beschrijving van de reden waarom de dieren moeten worden gedood, want dit geeft informatie over de doelstelling van het project en over hetgeen wordt gemeten. Het gaat hier om concurrentiegevoelige informatie, die ook al eerder in de documenten – en naar het oordeel van de CCD terecht – is geweigerd.

Tenslotte hebben wij geconstateerd dat niet alle middels het bestreden besluit geweigerde gegevens terecht zijn geweigerd. Enkele gegevens betreffen algemeen bekende termen (mate van gevoeligheid en prebiotica) en een algemeen bekend model. Het gaat om gegevens in document 2 ((algemene) term (mate van gevoeligheid), pagina 7, 8, 11, 12 en 13 van het geheel; prebiotica, pagina 8, 9, 11 en 13 van het geheel; de volledige titel van de bijlage beschrijving dierproeven, pagina 14 van het geheel), document 4 (de volledige titel van de bijlage beschrijving dierproeven, pagina 16 van het geheel) en document 5 (de volledige eerste zin onder het doel van het project, pagina 30 van het geheel). Deze gegevens worden middels dit besluit aanvullend geopenbaard.



#### **Ten aanzien van bezwaar 5**

Op basis van het hiernavolgende slaagt deze grond niet.

U heeft in uw bezwaarschrift aangegeven dat de stelling dat bij openbaarmaking gegevens niet meer beschermd worden door intellectuele eigendomsrechten geen hout snijdt. Ook het argument dat er nog patent moet worden aangevraagd, houdt volgens u geen stand. Onderzoeksstrategieën zijn naar uw mening bovendien niet patentwaardig.

Vooropgesteld zij dat de betreffende informatie (in vergunning 2016467) is geweigerd, omdat sprake is van concurrentiegevoelige informatie (zie onder bezwaar 6, waar hierop nader wordt ingegaan).

In veel gevallen is bescherming van de onderzoeksstrategie middels intellectueel eigendom nog niet mogelijk, nu dit onderzoek zich nog in de beginfase bevindt. De betreffende vergunning (2016467) heeft een looptijd tot en met 2021, waardoor dit onderzoek zich nog altijd in de beginfase bevinden. Het voornemen van onderzoeker om patent aan te vragen, werkt signalerend voor het belang van het onderzoek en daarmee om de te weigeren informatie geweigerd te houden.

De CCD is van oordeel dat nu het onderzoek nog grotendeels moet worden uitgevoerd, er dus nader onderzoek nodig is en er nog geen publicaties zijn geweest over het voorliggende onderzoek, het niet wenselijk is dat onder andere de strategie van de komende tijd al in deze fase wordt geopenbaard. Onderdelen worden nog getest en pas na de dierproeven worden resultaten duidelijk en dus ook of bescherming middels intellectueel eigendomsrecht mogelijk is. Wanneer deze betreffende informatie reeds nu wordt geopenbaard, is verder onderzoek niet meer van belang.

De CCD is van oordeel dat deze informatie terecht is geweigerd en dat de vergunninghouder voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling van de betrokken onderzoekers, als bedoeld in artikel 10 lid 2 sub g van de Wob, zwaarder moet wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van de hiervoor genoemde concurrentiegevoelige gegevens. De CCD verwijst hierbij naar de uitspraak van de rechtbank Gelderland van 3 juli 2017 (ECLI:NL:RBGEL:2017:3427).

#### **Ten aanzien van bezwaar 6**

Op basis van het onderstaande slaagt deze grond deels. De motivering uit het bestreden besluit wordt aangevuld.

Tijdens de hoorzitting heeft u tenslotte aangegeven dat in de vergunningen 2016462, 2016464, 2016465, 2016466 en 2016467 ten onrechte passages zijn geweigerd. In vergunning 2016462 worden de mate van ongerief en het humane eindpunt volgens u ten onrechte geweigerd. In vergunning 2016467 worden volgens u bepaalde cellen, omschrijvingen van dieren, de mate van ongerief en het nummer van een DEC-aanvraag ten onrechte geweigerd. Voor de volledigheid zullen ook de weigeringen op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob in vergunning 2016461 kort worden besproken.

In vergunning 2016461 is blijkens de inventaris informatie geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob in de documenten 1, 2, 4, 5, 6, 8 en 9. In alle documenten gaat het echter om namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen of om handtekeningen. De CCD is met u van oordeel dat deze gegevens terecht zijn geweigerd.

Uit het bestreden besluit en de documenten volgt dat voor wat betreft vergunning 2016462 in de documenten 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10 en 11 informatie is geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. In de documenten 1, 6, 7, 10 en 11 betreft dit namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen. De CCD blijft bij het standpunt dat deze gegevens terecht zijn geweigerd, zoals reeds elders in het besluit is gemotiveerd.

In document 2 (op pagina 10 van het geheel) zijn de namen van samenwerkingspartners geanonimiseerd. Uit het verloop van de zinnen valt af te leiden op welke plaatsen in de documenten hier sprake van is. In verband met de rechtstreekse herleidbaarheid naar personen worden de namen van de partners, waarmee door de vergunninghouder wordt samengewerkt, geweigerd. In dit kader verwijst de CCD naar de uitspraak van de Afdeling van 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952). De motivering uit het bestreden besluit – onder het voorkomen van onevenredige bevoordeling of benadeling, herleidbaarheid – wordt middels deze passage aangevuld.

In document 2 (op pagina 13 en 14 van het geheel) is voorts concurrentiegevoelige informatie geweigerd op grond van het voorkomen van onevenredige benadeling voor de betrokken onderzoekers. Het betreft informatie over essentiële stappen in het onderzoek, waarbij tussentijds mogelijke uitkomsten worden weergegeven. Deze stappen geven inzicht in de afwegingen van de onderzoekers op belangrijke punten in het onderzoek. Deze uitkomsten dienen niet voortijdig geopenbaard te worden, omdat concurrenten – bij voortijdige openbaarmaking – hier hun voordeel mee kunnen doen.

Ook in document 4 is de geanonimiseerde informatie geweigerd op grond van het zijn van concurrentiegevoelige informatie. U heeft aangegeven dat in dit document het humane eindpunt en de mate van ongerief zijn geweigerd. Dit is echter niet juist, nu slechts een klein gedeelte van de gegevens in deze onderdelen is geweigerd (in totaal twee zinnen). Bovendien staan informatie over het humane eindpunt en de mate van ongerief in de reeds openbare niet-technische samenvatting vermeld en daarmee is deze informatie al openbaar.

De weigeringen in document 5 komen overeen met de weigeringen in de documenten 2 en 4 en blijven op basis van de hiervoor reeds genoemde gronden geweigerd. In document 8 wordt nader ingegaan op de geweigerde informatie in de documenten 2 en 4. Nu wordt ingegaan op gegevens die al eerder geweigerd zijn, dienen ook deze gegevens – op grond van hetgeen hiervoor reeds is aangegeven – geweigerd te blijven.

Voor wat betreft vergunning 2016464 volgt uit zowel het besluit als de bijbehorende inventaris dat in de documenten 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10 en 11 informatie is geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. In de documenten 1, 7, 8, 10 en 11 betreft het namen, locatiegegevens, gegevens die



direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen. De CCD is van oordeel dat deze gegevens terecht zijn geweigerd op grond van hetgeen in het bestreden besluit is aangegeven.

In de documenten 2, 4, 5 en 6 zijn referenties die naar eigen onderzoekers leiden die ook betrokken zijn bij het huidige onderzoek geweigerd. De CCD is van oordeel dat deze referenties terecht zijn geweigerd, omdat openbaarmaking immers direct leidt tot de betrokken onderzoekers. De CCD is van oordeel dat het belang van openbaarmaking in dit geval niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling als gevolg van herleidbaarheid naar de personen van de onderzoeksgroep en het belang van bescherming van de persoonlijke levenssfeer van de betrokken personen.

Ditzelfde geldt voor de overige informatie die in de documenten 2, 4, 5 en 6 is geweigerd. Dit betreft in alle gevallen informatie die direct naar de betrokken onderzoekers leidt. Deze informatie blijft op grond van hetgeen in de vorige alinea en in het bestreden besluit is aangegeven geweigerd. Ook in deze gevallen weegt het belang van openbaarmaking niet op tegen het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling als gevolg van herleidbaarheid naar de personen van de onderzoeksgroep en het belang van bescherming van de persoonlijke levenssfeer van de betrokken personen.

Aangaande vergunning 2016465 blijkt uit de inventaris dat in de documenten 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15 en 17 informatie is geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. Voor wat betreft de documenten 1, 7, 8, 9, 15 en 17 gaat het om namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en handtekeningen. Deze gegevens zijn naar het oordeel van de CCD terecht geweigerd.

In de documenten 2, 4, 5, 6, 10, 12, 13 en 14 zijn op verschillende plaatsen de namen van collega's en samenwerkingspartners geanonimiseerd. Uit het verloop van de zinnen valt af te leiden op welke plaatsen in de documenten hier sprake van is. In verband met de rechtstreekse herleidbaarheid naar personen worden de namen van de partners, waarmee door de vergunninghouder wordt samengewerkt, geweigerd. In dit kader verwijst de CCD naar de uitspraak van de Afdeling van 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952). De motivering uit het bestreden besluit wordt middels deze passage aangevuld.

Daarnaast worden in deze documenten de namen van leveranciers genoemd. Deze namen dienen geweigerd te blijven, nu sprake is van bedrijfs- en fabricagegegevens. Inzichtelijk is namelijk dat deze in stukken neergelegde informatie, afzonderlijk en in onderlinge samenhang beschouwd, is aan te merken als concurrentiegevoelige bedrijfsinformatie, waarvan openbaarmaking leidt tot wetenswaardigheden met betrekking tot de technische bedrijfsvoering of het productieproces, dan wel met betrekking tot de afzet van producten of de kring van afnemers en leveranciers.

In de documenten 2 en 10 zijn referenties die naar eigen onderzoekers leiden, die ook betrokken zijn bij het huidige onderzoek, geweigerd. De CCD is van oordeel dat deze referenties terecht zijn geweigerd, omdat openbaarmaking immers direct leidt tot de betrokken onderzoekers. De CCD is van oordeel dat het belang van

openbaarmaking in dit geval niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling als gevolg van herleidbaarheid naar de personen van de onderzoeksgroep en het belang van bescherming van de persoonlijke levenssfeer van de betrokken personen. Deze referenties worden veelvuldig in deze documenten herhaald, zowel volledig als in afgekorte vorm.

De overige geweigerde informatie betreft concurrentiegevoelige informatie. In al deze (overgebleven) gevallen gaat het om eiwitten/proteïnen die (figuurlijk) vergelijkbaar zijn met de ingrediënten en de bereidingswijze in een recept voor een gerecht. Deze informatie geeft inzicht in het onderzoek zelf en in de totstandkoming van het onderzoeksresultaat. Zoals uit de documenten volgt, zijn de documenten 2 en 10, 4 en 12, 5 en 13 en 6 en 14, vrijwel identiek aan elkaar, waardoor de weigeringen en de hiervoor opgenomen motivering ook (vrijwel) identiek zijn. Op basis hiervan blijft deze informatie geweigerd.

In vergunning 2016466 is blijkens de inventaris in de documenten 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 en 13 informatie geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. In de documenten 1, 5, 6, 7, 8 en 13 gaat het (deels) om namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en om handtekeningen. Deze gegevens zijn naar het oordeel van de CCD terecht geweigerd.

In de documenten 2, 4, 9 en 11 zijn op verschillende plaatsen de namen van collega's en samenwerkingspartners geanonimiseerd. Uit het verloop van de zinnen valt af te leiden op welke plaatsen in de documenten hier sprake van is. In verband met de rechtstreekse herleidbaarheid naar personen worden de namen van de partners, waarmee door de vergunninghouder wordt samengewerkt, geweigerd. In dit kader verwijst de CCD naar de uitspraak van de Afdeling van 5 april 2017 (ECLI:NL:RVS:2017:952). De motivering uit het bestreden besluit wordt middels deze passage aangevuld.

In de documenten 2, 4, 9 en 11 zijn referenties die naar eigen onderzoekers leiden die ook betrokken zijn bij het huidige onderzoek geweigerd. De CCD is van oordeel dat deze referenties terecht zijn geweigerd, omdat openbaarmaking immers direct leidt tot de betrokken onderzoekers. De CCD is van oordeel dat het belang van openbaarmaking in dit geval niet opweegt tegen het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling als gevolg van herleidbaarheid naar de personen van de onderzoeksgroep en het belang van bescherming van de persoonlijke levenssfeer van de betrokken personen.

In de documenten 2, 4, 8, 9 en 11 is voorts concurrentiegevoelige informatie geweigerd. Dit onderzoek hangt samen met het onderzoek in vergunning 2016465 (zie hierboven) en in bepaalde gevallen is dezelfde informatie met betrekking tot eiwitten/proteïnen geweigerd. Daarnaast zijn ook specifieke therapeutica en vergelijkingen geweigerd. Ook met betrekking tot deze gegevens is de CCD van oordeel dat deze gegevens (figuurlijk) vergelijkbaar zijn met de ingrediënten en de bereidingswijze in een recept voor een gerecht en inzicht geven in het onderzoek zelf en de totstandkoming van het onderzoeksresultaat. Op basis hiervan blijft deze informatie geweigerd.





Tenslotte volgt uit het besluit en de bijbehorende documenten dat in vergunning 2016467 in de documenten 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14 en 16 informatie is geweigerd op grond van artikel 10 lid 2 sub g van de Wob. In de documenten 1, 8 en 9 gaat het hierbij slechts om namen, locatiegegevens, gegevens die direct herleidbaar zijn tot natuurlijke personen en om handtekeningen. Deze gegevens zijn naar het oordeel van de CCD terecht geweigerd.

In de documenten 2, 4, 5, 6, 7, 10, 12, 13, 14 en 16 staan concurrentiegevoelige gegevens, welke naar het oordeel van de CCD terecht zijn geweigerd. Zoals uit het bestreden besluit volgt, is een specifieke combinatie geweigerd, is een nieuwe onderzoekslijn geweigerd en zijn cellen, cel aantallen en specifieke markers geweigerd. Deze gegevens zijn uniek en kenmerkend voor het betreffende onderzoek. Bovendien geven deze gegevens inzicht in de totstandkoming van het onderzoeksresultaat. De CCD is van oordeel dat de vergunninghouder voldoende aannemelijk heeft gemaakt dat het belang van het voorkomen van onevenredige benadeling van de betrokken onderzoekers zwaarder moet wegen dan het publieke belang bij openbaarmaking van deze concurrentiegevoelige gegevens.

Zoals uit de documenten volgt, zijn de documenten 2 en 10, 4 en 12, 5 en 13 en 6 en 14, vrijwel identiek aan elkaar, waardoor de weigeringen en de hiervoor opgenomen motivering ook (vrijwel) identiek zijn. Op basis hiervan blijft deze informatie geweigerd.

Tijdens de hoorzitting heeft u aangegeven dat in vergunning 2016467 bepaalde cellen, omschrijvingen van dieren, de mate van ongerief en het nummer van een DEC-aanvraag ten onrechte worden geweigerd. Op het weigeren van specifieke cellen is hiervoor reeds ingegaan. Voor wat betreft de omschrijvingen van dieren is de CCD van oordeel dat deze gegevens niet zijn geweigerd. In onderdeel B 'De dieren' van de documenten 4, 5, 6, 12, 13 en 14 is weliswaar informatie geweigerd, maar dit betreft niet de omschrijvingen van dieren, maar de hiervoor genoemde concurrentiegevoelige informatie.

De CCD is van oordeel dat ook de mate van ongerief in de documenten niet is geweigerd. Bovendien is de mate van ongerief middels de niet-technische samenvatting op de website van de CCD reeds openbaar. In document 12 is onder een kopje over ongerief een woord geweigerd, maar dit betreft het soort dier en niet de mate van ongerief.

De CCD kan u voorts niet volgen in uw redenering dat het nummer van een DEC-aanvraag is geweigerd. Wellicht doelt u op hetgeen bovenaan in document 2 (pagina 13 van het geheel) en bovenaan in document 10 (pagina 66 van het geheel) staat. Dit betreft echter de naam van de betrokken onderzoeker, welke op basis van reeds eerder genoemde redenen is geweigerd.

#### **Verzoek proceskostenvergoeding**

U heeft verzocht om proceskostenvergoeding door toepassing te geven aan artikel 7:15 Awb. Ingevolge artikel 7:15 lid 2 Awb komen de kosten die de belanghebbende in verband met de behandeling van het gemaakte bezwaar heeft 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 heeft u recht op een vergoeding van € 1.002,- zijnde 1 punt á € 501,- voor het ingediende bezwaarschrift en 1 punt á € 501,- voor de gehouden hoorzitting.

#### **Wijze van openbaarmaking**

Aangezien de mogelijkheid bestaat dat belanghebbenden bezwaar hebben tegen de openbaarmaking van de informatie vindt de feitelijke openbaarmaking van de documenten niet eerder plaats, dan vier 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 dient u wel te beschikken over een elektronische handtekening (DigiD). Kijk op de genoemde site voor de precieze voorwaarden.

#### **Tot slot**

In deze brief is 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 via 0900 28 000 28 (10 ct/minuut).

Hoogachtend,

De Centrale Commissie Dierproeven,

dr. L. Hellebrekers  
Voorzitter

b.a. : B. J. Blaauw

| <b>Inventaris Wob-verzoek W16-16S</b> |                                  |                        |             |               |              |                          |               |               |             |
|---------------------------------------|----------------------------------|------------------------|-------------|---------------|--------------|--------------------------|---------------|---------------|-------------|
|                                       |                                  | <b>wordt verstrekt</b> |             |               |              | <b>weigeringsgronden</b> |               |               |             |
| <b>nr.</b>                            | <b>document</b>                  | <b>reeds openbaar</b>  | <b>niet</b> | <b>geheel</b> | <b>deels</b> | <b>10.1.c</b>            | <b>10.2.e</b> | <b>10.2.g</b> | <b>11.1</b> |
|                                       | <b>NTS2016460</b>                |                        |             |               |              |                          |               |               |             |
| 1                                     | Aanvraagformulier                |                        |             |               | x            |                          | x             | x             |             |
| 2                                     | Projectvoorstel                  |                        |             |               | x            | x                        |               | x             |             |
| 3                                     | Niet-technische samenvatting     | x                      |             |               |              |                          |               |               |             |
| 4                                     | Bijlage beschrijving dierproeven |                        |             |               | x            | x                        |               | x             |             |
| 5                                     | Poweranalyse                     |                        |             |               | x            | x                        | x             | x             |             |
| 6                                     | DEC-advies                       |                        |             |               | x            | x                        |               | x             |             |
| 7                                     | Ontvangstbevestiging             |                        |             |               | x            |                          | x             | x             |             |
| 8                                     | Advies CCD                       |                        | x           |               |              |                          |               |               | x           |
| 9                                     | Beschikking en vergunning        |                        |             |               | x            |                          | x             | x             |             |



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.zbo-ccd.nl](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?<br><i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>                          | <input type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 10800<br><input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen |  |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.   | Naam instelling of organisatie  | Universiteit Utrecht   |
|     |   | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde   | [REDACTED]   |
|     |   | KvK-nummer  | 30275924   |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | Straat en huisnummer  | [REDACTED]   |
|     |   | Postbus   | 12007  |
|     |   | Postcode en plaats  | [REDACTED]   |
|     |   | IBAN  | [REDACTED]   |
|     |   | Tenaamstelling van het rekeningnummer   | Universiteit Utrecht   |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.  | (Titel) Naam en voorletters   | [REDACTED] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
|     |   | Functie   | [REDACTED]   |
|     |   | Afdeling  | [REDACTED]   |
|     |   | Telefoonnummer  | [REDACTED]   |
|     |   | E-mailadres   | [REDACTED]   |
| 1.5 | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.  | (Titel) Naam en voorletters   | [REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
|     |   | Functie   | [REDACTED]   |
|     |   | Afdeling  | [REDACTED]   |
|     |   | Telefoonnummer  | [REDACTED]   |
|     |   | E-mailadres   | [REDACTED]   |

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |              |
|------------|--------------|
| Startdatum | 01 -4 - 2016 |
| Einddatum  | 01 -4 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- |   |
|---|
| Study of dietary intervention with human milk oligosaccharides in order to improve immu |
|---|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- |  |
|--|
| Effect van voeding op de ontwikkeling van een gezond afweersysteem |
|--|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |  |
|-------------|--|
| Naam DEC    | DEC Utrecht  |
| Postadres   | Huispostnummer D01.343, Postbus 85500, 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl                              |

## 4 Betaalgegevens

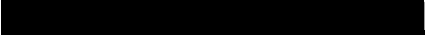
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935,= Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

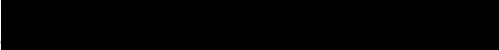
## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?
- Verplicht
- Projectvoorstel
- Niet-technische samenvatting
- Overige bijlagen, indien van toepassing
- Melding Machtiging
- Appendix 1

## 6 Ondertekening

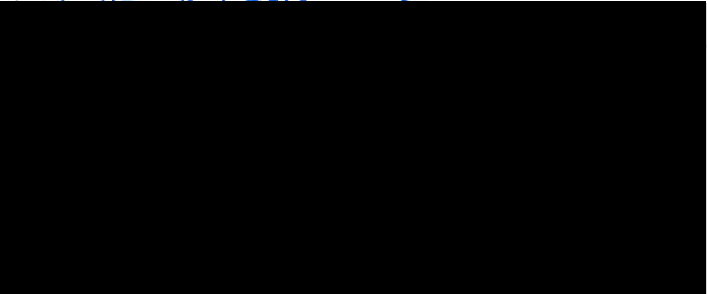
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.6). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

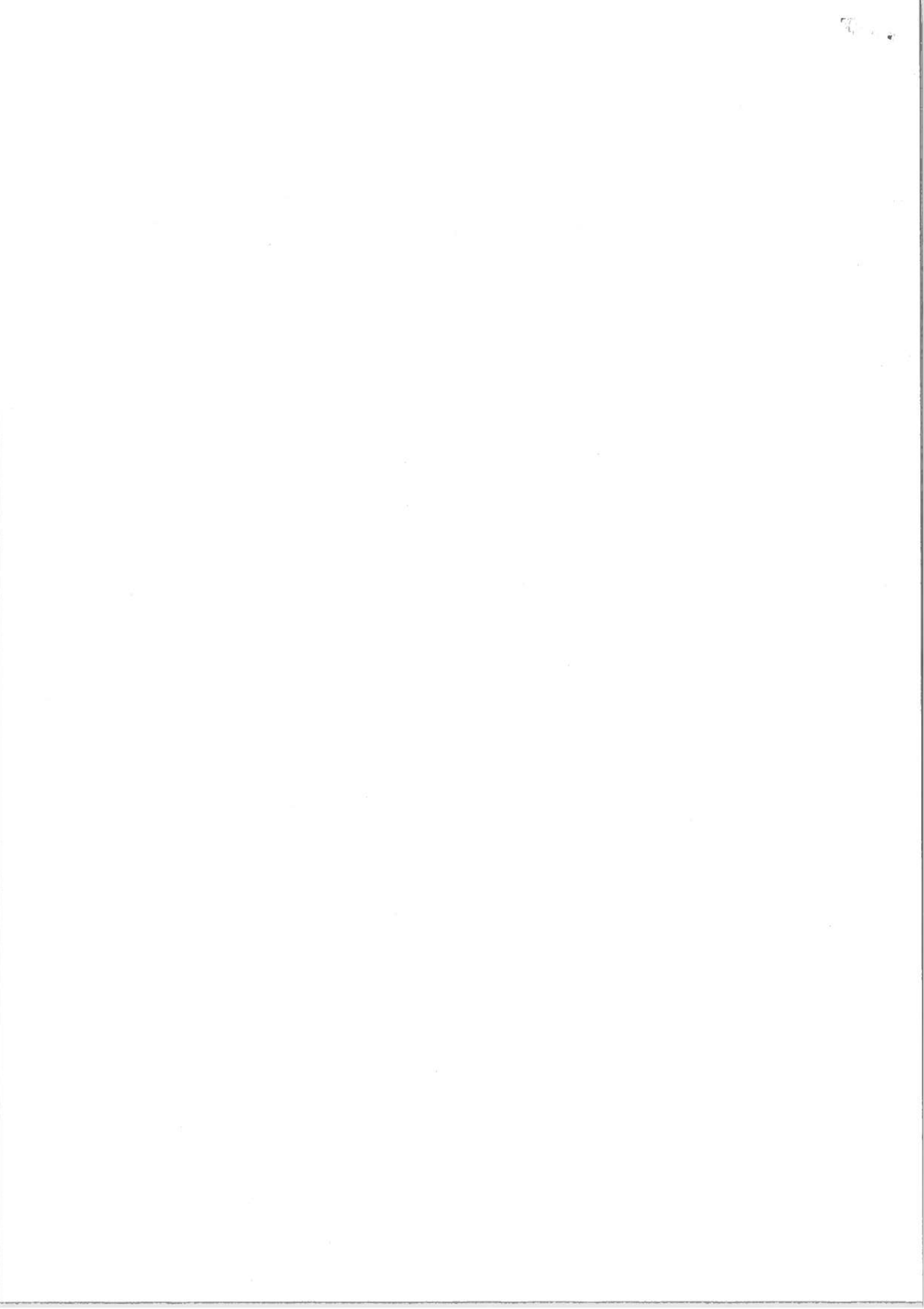
Naam 

Functie 

Plaats Utrecht

Datum 7-03-2015

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



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.

Both UNICEF and the World Health Organisation (WHO) recommend exclusive breastfeeding up to the age of 6 months, with continued breastfeeding along with appropriate complementary foods up to the age of two years or even beyond. Numerous positive health benefits are associated with breast-feeding including reduced risk for infections. Human milk is therefore not only a comprehensive source of nutrition, it is also a well-established immune-factor helping immune defence against many different infections and diseases (*Ajetunmobi 2015*). Several studies have already shown that nutritional interventions, can enhance immune functions of infants and adults through boosting specific immune responses (*Schley 2002, Link-Amster 1994, de Vrese 2005, Haschke 2007*). For example our own unpublished work [REDACTED]

[REDACTED] Moreover, previous studies using this vaccination model focused on the oligosaccharides derived from sources other than human milk and have shown translational capacity to humans (*Arslanoglu S, 2008*) in terms of immune modulation. [REDACTED]

1. [REDACTED]

2. [REDACTED]

Within this research project we will study the immunological importance of unique and specific human milk components (HMOS) regarding their role in immune development. [REDACTED]

[REDACTED] HMOS are a family of structurally diverse unconjugated glycans that are highly abundant in and unique to human milk. The composition of human milk varies in time during feeding (*Bode L. 2012; Newburg DS, 2014*). We would like to understand the consequences hereof in terms of immune development, in order to support development of new immune modulating nutritional products (like infant formula).

Previous studies using chemical analogues of HMOS (combinations of a 9:1 mixture of galacto-oligosaccharides and long-chain fructo-oligosaccharides (scGOS/lcFOS)) have shown to be immune modulatory in a murine vaccination model (*Vos 2007*). Vaccine specific Delayed type hypersensitivity (DTH) as parameter for cellular T-helper 1 (Th1) dependent immunity was significantly increased in mice receiving scGOS/lcFOS containing diet as compared to mice receiving control diet. Moreover, in clinical studies, the same oligosaccharides have proven to be beneficial in terms of reducing infections and allergies when added to infant formula (*Arslanoglu 2007*). [REDACTED]

Moreover, the use of vaccination response parameters such as DTH responses for studying immunomodulation in nutritional intervention studies was advocated by an ILSI/WHO expert group.

[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?

New technologies have made new HMOS specific structures available for use in nutritional products. Within this research project we will study the immunological importance of these HMOS regarding their role in immune development.

We would like to understand the effect of these HMOS on immune development, in order to eventually support the development of new immune modulating nutritional products (like infant formula).

We regard the objective as achievable because: 1. [Redacted] as well as the proposed parameters based on our experience 2. Our hypothesis (objective) is theoretically possible according to the literature and based on our current knowledge about human milk oligosaccharides.

Therefore during the project, [Redacted]

#### Research question 1

[Redacted]

#### Research question 2

[Redacted]

#### Research Question 3

[Redacted]

#### Research question 4

[Redacted]

#### Research question 5

[Redacted]

### 3.3 Relevance

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

Both UNICEF and the World Health Organisation (WHO) still recommend exclusive breastfeeding up to the age of 6 months, with continued breastfeeding along with appropriate complementary foods up to the age of two years or even beyond. Numerous positive health benefits are associated with breast-feeding including reduced risk for infections, reduced development of autoimmunity like type 1 diabetes and reduced onset of allergies. Human milk is therefore not only a comprehensive source of nutrition, it is also a well-established immune-factor helping immune defence against many different infections and diseases (Ajetunmobi 2015). Nevertheless, it is less known what the individual contribution of breast milk specific components is to the development of the immune system, therefore, even modern infant formula lack especially components (HMOS), which are tailor-made by each mum in time for the immune development of her baby.

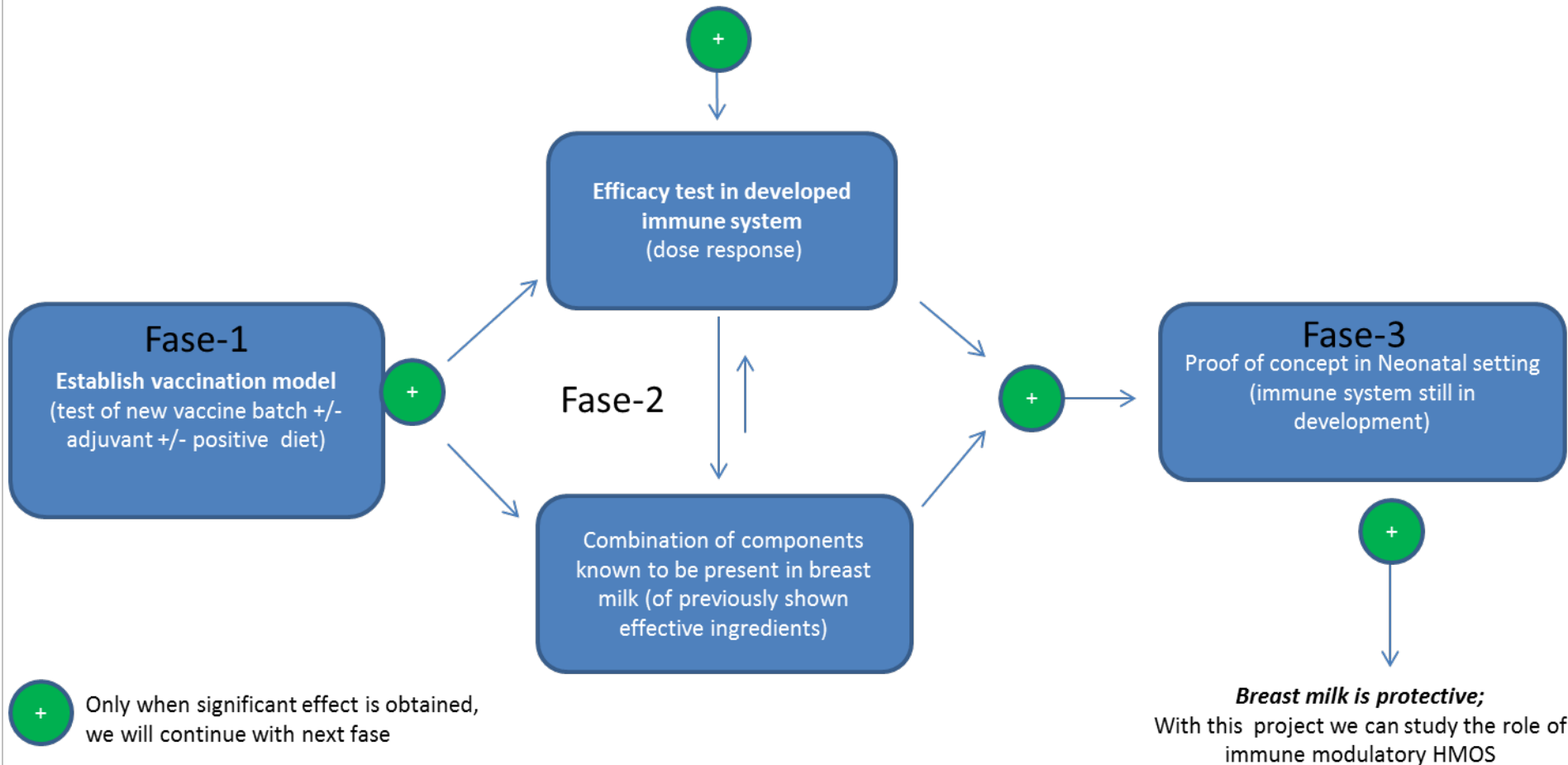
Thus, it may contribute to human health, specifically the infant's developing immune system. In addition, obtained knowledge may in the future also be used to support people with failing or reduced immune capacity.

### **3.4 Research strategy**

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

#### **Research Strategy:**

Based on breast milk composition analysis, in vitro tests and literature we will identify new human milk specific immune modulatory components (HMOS)



**Figure 1.** Our research strategy as depicted in this figure, is based on first the identification of new human milk specific immune modulatory components (HMOS), prior to testing them in the selected in vivo model. The in vivo testing will be done within three fases as indicated. Fase 1 is the model evaluation (RQ1), Fase 2 is the fase in which we will address RQ 2-4, and in Fase 3 we will address RQ 5, as described in detail below.

**+** Is indicative for a discision point: Only when significant effect is obtained, we will continue with next fase.

---

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.

**Fase 1 => research question 1 (RQ1);** [REDACTED]

[REDACTED] As the commercially available vaccine is changing in composition each year, we will need to establish not only the vaccine efficiency of this new vaccine, but also proof that we can detect the dietary immune modulation in terms of increased DTH as previously shown (Vos et al 2007) when using the new vaccine. Previous studies using this vaccination model focused on the oligosaccharides derived from sources other than human milk and have shown translational capacity to humans (Arslanoglu S, 2008) in terms of immune modulation. Therefore we want to be sure that also using the new vaccine we can detect known immune modulation capacity of the diet. i.e. RQ1 is therefore not only to study the DTH-response induced by the new vaccine [REDACTED]

**Fase 2 => research question RQ2, 3 and 4;** [REDACTED]

[REDACTED] Previous studies using this vaccination model focused on the oligosaccharides derived from sources other than human milk and have shown translational capacity to humans (Arslanoglu S, 2008) in terms of immune modulation. Therefore we use the same model, but current study focuses on HMOS (RQ2) we will test these HMOS in order to identify optimal concentration of the single ingredient. Based on breast milk composition analysis, in vitro tests and literature we have now identified 3 new HMOS which we want to test within this model.

**Fase 3 => research question 5;** [REDACTED]

[REDACTED] As neonatal mice have an immune system which is still in development it will be difficult to identify immune modulating HMOS on top of these developmental changes, therefore at a later stage within the research project we will test one of the optimal HMOS (or combination hereof) [REDACTED]

[REDACTED] The measurable effects from maternal consumption on pups have been demonstrated by several studies (Hogekamp, 2015; Reiko, 2010).

---

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.

Only when a significant effect is obtained in **Fase 1** we will continue with **Fase 2** of the project, and when optimal combination / concentration of immune modulatory HMOS is established we will continue with **Fase 3** of the project. Individual experiments within each Fase are explained in detail within the appendix and depicted within table below.

| Establish vaccination model (fase 1)<br>Experiment (n) | Efficacy test in developed immune system (fase 2)<br>Experiment (n) | Proof of concept in Neonatal setting (fase 3)<br>Experiment ( n = pups + moms )        |
|--|---|--|
| Exp 1a without adjuvant ( 75 )                         | Exp 2 HMOS1 ( 57 )  | Exp 11a without adjuvant( 75+30 )  |
| Exp 1b with adjuvant ( 75 )                            | Exp 3 HMOS2 ( 57 )  | Exp 11b with adjuvant ( 75+30 )  |
|  | Exp 4 HMOS1+2 ( 75 )  | Exp 12 HMOS 1/2/3 ( 48+20+27(milking moms) )   |
|  | Exp 5 HMOS3 ( 57 )  | Exp 13 HMOS 1+2+3 ( 57+24 )  |
|  | Exp6 HMOS1+3 ( 75 )   |  |
|  | Exp7 HMOS2+3 ( 75 )   |  |
|  | Exp8 HMOS1+2+3 ( 198 )  |  |
|  | Exp 9 Timing HMOS 1/2/3 ( 66 )                                      |  |
|  | Exp 10 Timing HMOS 1+2+3 ( 66 )                                     |  |
| Total nr of mice ( 150 )                               | Total nr of mice ( 726 )  | Total nr of pups ( 255 )<br>Total nr of breeders( ( Dams 104 ) + ( Milking moms 27 ) ) |

The choice of HMOS as well as the combinations of HMOS is based on our previous studies, as well as newly available information regarding breast milk composition changes.

***In short:***

**Fase 1- Experiment 1a/b.** A pilot study will be carried out in order to determine the efficacy of a new vaccine batch. A vaccine titration experiment (+/- adjuvant) will indicate the dose to induce the maximal DTH difference between diets. The mice will receive either control diet (AIN93G diet) or a positive control diet (diet including prebiotic oligosaccharides with known immune modulatory capacity like scGOS/lcFOS (Vos et al 2007))

**Fase2-**



It is known that breast milk composition changes over time, [redacted]

**Fase 3:**

For this fase, we will set up breeding pairs (2 Dams with one male mice (male mice are not included in experiment / protocol) as we expect 50% pregnancy rate). Per Dam we expect an average of 5 pups (3-7 pups per nest), meaning that for an experiment with 75 mice we will start with 15 breeding pairs, = 30 mice (female). The surplus pups will be kept until 6 weeks of age, then their bone marrow cells and spleen cells will be used to conduct ex vivo experimentation supporting the generation of knowledge regarding the immune modulation of HMOS.

| Fase                      | Animals (n)                  |
|---------------------------|------------------------------|
| Fase 1                    | 150                          |
| Fase 2                    | 726                          |
| Fase 3                    | 386                          |
|                           | 255 pups                     |
|                           | 104 female breeders          |
|                           | 27 milking moms              |
| Extra (male for breeding) | 57                           |
| Total                     | 1319 incl 5% non-responders. |

**Schematic graph and all experimental details are included within the appendix: 'Study of dietary intervention in a vaccination model in mice'**

**References:**

@ Ajetunmobi OM, Whyte B, Chalmers J, Tappin DM, Wolfson L, Fleming M, et al. Breastfeeding is associated with reduced childhood hospitalization: evidence from a Scottish Birth Cohort (1997-2009). J Pediatr. 2015;166(3):620-5 e4

@ Schley P D, Field C J. The immune-enhancing effects of dietary fibres and prebiotics [J]. British Journal of Nutrition, 2002, 87(S2): S221-S230.

@ Link-Amster H, Rochat F, Saudan K Y, et al. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake [J]. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 1994, 10(1): 55-63.

@ de Vrese M, Rautenberg P, Laue C, et al. Probiotic bacteria stimulate virus-specific neutralizing antibodies following a booster polio vaccination [J].

European journal of nutrition, 2005, 44(7): 406-413.

@ Haschke F, Firmansyah A, Meng M, et al. Functional food for infants and children [J]. Monatsschrift Kinderheilkunde, 2001, 149(1): S66-S70.

@ Ling X, et al. Modulation and programming of immunity and intestinal microbiota through early life supplementation with human milk oligosaccharides in an autoimmune mouse model. Unpublished.

@ Bode L. Human milk oligosaccharides: every baby needs a sugar mama. Glycobiology. 2012;22(9):1147-62.

@ Newburg DS, Grave G. Recent advances in human milk glycobiology. Pediatr Res. 2014;75(5):675-9.

@ Vos A P, Haarman M, Van Ginkel J W H, et al. Dietary supplementation of neutral and acidic oligosaccharides enhances Th1-dependent vaccination responses in mice [J]. Pediatric allergy and immunology, 2007, 18(4): 304-312.

@ Vos A P, Knol J, Stahl B, et al. Specific prebiotic oligosaccharides modulate the early phase of a murine vaccination response. International immunopharmacology, 2010 10: 619-625.

@ Arslanoglu S, Moro GE, Boehm G. Early supplementation of prebiotic oligosaccharides protects formula-fed infants against infections during the first 6 months of life. J Nutr. 2007;137(11):2420-4.

@ Meijer K, de Vos P, Priebe M G. Butyrate and other short-chain fatty acids as modulators of immunity: what relevance for health? [J]. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 2010, 13(6): 715-721.

@ Arslanoglu S, Moro G E, Schmitt J, et al. Early dietary intervention with a mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of allergic manifestations and infections during the first two years of life [J]. The Journal of nutrition, 2008, 138(6): 1091-1095.

@ Fujiwara R, Takemura N, Watanabe J, et al. Maternal consumption of fructo-oligosaccharide diminishes the severity of skin inflammation in offspring of NC/Nga mice [J]. British journal of nutrition, 2010, 103(04): 530-538.

@ Hogenkamp A, Thijssen S, van Vlies N, et al. Supplementing pregnant mice with a specific mixture of nondigestible oligosaccharides reduces symptoms of allergic asthma in male offspring [J]. The Journal of nutrition, 2015, 145(3): 640-646.

---

#### 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             | Study of dietary intervention in a vaccination model in mice |
| 2             |  |
| 3             |  |
| 4             |  |
| 5             |  |
| 6             |  |
| 7             |  |
| 8             |  |
| 9             |  |
| 10            |  |







## Appendix Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.
- A different appendix 'description animal procedures' should be enclosed for each type of animal procedure.
- For more information, see our website ([www.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'. | 10800   |               |                          |   |  |
|--|---|---------------|--------------------------|---|--|
| 1.2 Provide the name of the licenced establishment.  | University of Utrecht   |               |                          |   |  |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure.   | <table border="0" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Serial number</th> <th style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Type of animal procedure</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">1</td> <td style="border: 1px solid black; padding: 2px;">Study of dietary intervention in a vaccination model in mice</td> </tr> </tbody> </table> | Serial number | Type of animal procedure | 1 | Study of dietary intervention in a vaccination model in mice |
| Serial number  | Type of animal procedure  |               |                          |   |  |
| 1  | Study of dietary intervention in a vaccination model in mice  |               |                          |   |  |

*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.

It is well known that breast milk is protective against infections and contains immune modulating components. [REDACTED]



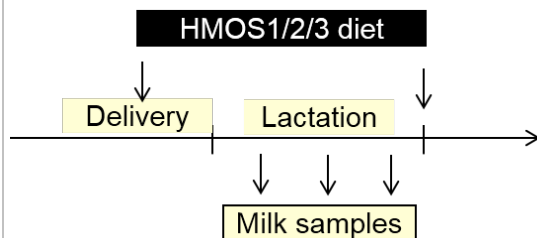
Describe the proposed animal procedures, including the nature, frequency and duration of the treatment. Provide justifications for the selected approach.

- Shaving (small marker spots) of animals at arrival (shaving will be repeated in time when needed);
- Weekly weighing of the animals until the end of the experiment;
- Five times faecal sample collection (At arrival, before start intervention, end of intervention, before last vaccination, end of experiment);
- Start of the intervention (i.e. change of diets either with or without test ingredients see experimental set-up) starting 2 weeks prior to the immunisation (unless otherwise mentioned per experiment);
- [REDACTED]
- 24h later measuring ear thickness under isoflurane anaesthesia;
- Terminal bleeding under anaesthesia followed by cervical dislocation and collect organs/tissues/body fluids of interest for further analysis.

In addition, (when required to answer the research question) animals can be sacrificed at different time points during the protocol [REDACTED]. In addition, (when required to answer the research question) dietary interventions can be stopped and started at different time points during the protocol [REDACTED].

This project studying [REDACTED] in the developmental immune system i.e. in neonatal mice starting with the vaccination not before day 7 after birth (therefore see Breeding protocol below).

**Breeding protocol:** At arrival the mice ( $\pm$  9 weeks old, day 0) will be housed in groups. After 1.5 weeks acclimatizing the mating pairs (1 male with 2 females) are made and the breeding starts (day 12). The females are housed in pairs until they are clearly pregnant, then the females will be housed separately to prevent stress at the end of the pregnancy and with delivery of the pups (average of 5 pups per dam anticipated). The new born pups will be pooled and assigned to each nursing mother (5-10 pups/dam). Nests will be assigned randomly to control and experimental groups. [REDACTED]



**Figure 2.** Scheme of testing milk samples at different time points during lactation. [REDACTED]

██████████ doses and injection volume will be adjusted and related to body weight. The primary ██████████ will be given at day 7 and the booster 21 days later, after which at day 30 the DTH response will be measured, as indicated in the representative experiment given before.

**References:**

1. Vos, A.P., et al., Dietary supplementation of neutral and acidic oligosaccharides enhances Th1-dependent vaccination responses in mice. *Pediatr Allergy Immunol*, 2007. 18(4): p. 304-12.

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



The power analysis is based on  $\alpha = 0.05$  and the power =  $(1 - \beta) = 0.90$ . These choices are based on:

- 1) In our research field it is usual that  $\alpha$  is equal or less than 0.05 (Type I error as small as possible) and the power is high so that we may reject our null-hypothesis with a probability as big as possible that the control groups are equal to the experimental groups. The outcome of 10% increased ear thickness will be set as a small but very relevant difference. Because of this small marge, we like to minimize  $\beta$  to 0.1 and not use the 0.2 level and therefore power will be set on 0.90.
- 2) The reproducibility is strong , based on our experience gathered over a number of years therefore sigma ( $\sigma$ ) can be kept small.
- 3) In order to establish a vaccination response an negative control is included within each experiment (sham groups; not taken in account in the statistical calculations) n=3 mice are sufficient to establish a good basic for normal ear thickness = no DTH response.
- 4) Based on previous work published by A.P. Vos et al 2006. One way ANOVA and post hoc Dunnett's test is applicable if multiple groups are compared to a single (control) group. Bonferroni post hoc tests will be performed after ANOVA if comparisons are made to multiple groups.
- 5) By use of the computer program "G\*Power" we calculated the needed numbers of animals ( $n$ ) per experimental group, depicted to be able to perform reliable statements and get biological relevant differences between DTH groups and experimental diet-treated groups regarding the several parameters that will be measured in these experiments. ██████████

██████████ (This calculation program has been downloaded via: <http://www.gpower.hhu.de> , Version 3.1.9.). The final number of **9** animals per experimental group as the come-out is a temporary estimate and before the start of the following experiments a recalculation is conducted (because of changed circumstances, variations are induced and can have influence on the numbers of animals needed per group) in consultation with the Animal Welfare Body.

The effect size in this case is the ratio of "minimum expected relevant difference between the 4 dose groups and the control DTH group" and "the standard deviation within a group".

|             | DTH (increased ear thickness (um)) | Relevant difference (=increased DTH) | Numbers (n) |
|-------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------|
| Vaccination | 243                                |                                      | 9           |

|                  |       |                                   |   |
|------------------|-------|-----------------------------------|---|
| HMOS (dose1)     | 269   | minimal relevant difference = 10% | 9 |
| HMOS (dose 2)    | 294   | 20%                               | 9 |
| HMOS (dose 3)    | 329   | 35%                               | 9 |
| HMOS (dose 4)    | 302   | 25%                               | 9 |
| SD within groups | 45.6  |                                   |   |
| Effect size      | 0.643 |                                   |   |
| alpha            | 0.05  |                                   |   |
| power            | 0.90  |                                   |   |

We estimated the increased DTH responses

#### Out-come of G\*Power program:

[1] -- Thursday, January 28, 2016 -- 07:49:48

**F tests** - ANOVA: Fixed effects, omnibus, one-way

**Analysis:** A priori: Compute required sample size

**Input:** Effect size f = 0.6428993

α err prob = 0.05

Power (1-β err prob) = 0.9

Number of groups = 5

**Output:** Noncentrality parameter λ = 18.5993779

Critical F = 2.6059749

Numerator df = 4

Denominator df = 40

Total sample size = 45

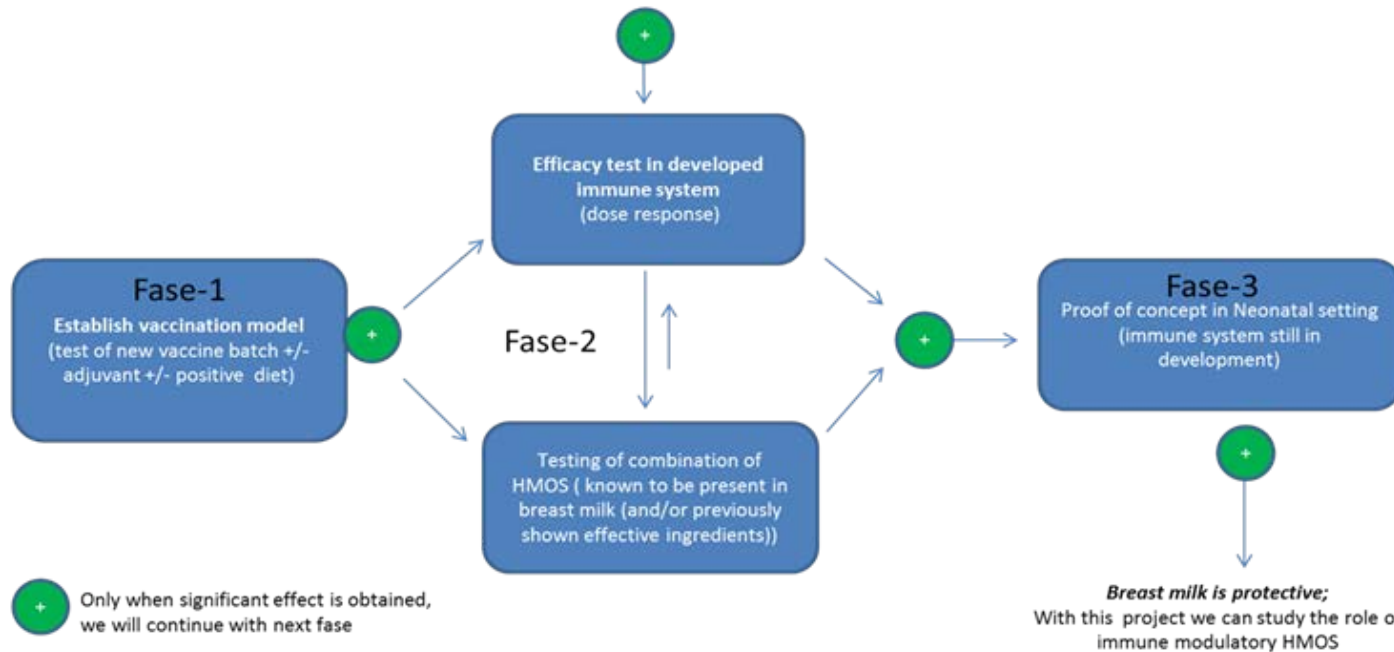
Actual power = 0.9211076

#### Conclusion:

In conclusion: regarding alpha error of 5% and a discernment of 90% there will be an effect of minimal 10% enhancement of the immune system in (diet-)supplemented groups when we will take 9 animals per group. On base of experience and literature, the negative control groups (sham) will be set on n=3 mice per group. Experiment 1a + 1b is a go or no-go experiment and we will establish first the immune effect of our positive control diet on the new batch with or without specol. Then, from experiment 2 - significant results of increased DTH responses between ingredient groups and control group will be tested. Because of the high variation, the number of 9 animals per experimental group is a temporary estimate and before the start of following experiments a recalculation is conducted in consultation with the Animal Welfare Body.

#### Experimental strategy

Based on breast milk composition analysis, in vitro tests and literature we will identify new human milk specific immune modulatory components (HMOS)



| Establish vaccination model (fase 1)<br>Experiment (n) | Efficacy test in developed immune system (fase 2)<br>Experiment (n) | Proof of concept in Neonatal setting (fase 3)<br>Experiment (n = pups + moms)      |
|--|---|--|
| Exp 1a without adjuvant ( 75 )                         | Exp 2 HMOS1 ( 57 )  | Exp 11a without adjuvant ( 75+30 )   |
| Exp 1b with adjuvant ( 75 )                            | Exp 3 HMOS2 ( 57 )  | Exp 11b with adjuvant ( 75+30 )  |
|  | Exp 4 HMOS1+2 ( 75 )  | Exp 12 HMOS 1/2/3 ( 48+20+27 (milking moms) )                                      |
|  | Exp 5 HMOS3 ( 57 )  | Exp 13 HMOS 1+2+3 ( 57+24 )  |
|  | Exp6 HMOS1+3 ( 75 )   |  |
|  | Exp7 HMOS2+3 ( 75 )   |  |
|  | Exp8 HMOS1+2+3 ( 198 )  |  |
|  | Exp 9 Timing HMOS 1/2/3 ( 66 )                                      |  |
|  | Exp 10 Timing HMOS 1+2+3 ( 66 )                                     |  |
| Total nr of mice ( 150 )                               | Total nr of mice ( 726 )  | Total nr of pup ( 255 )<br>Total nr of breeders ( (Dams 104) + (Milking moms 27) ) |

Fase 1:

Experiment 1.

[Redacted content for Experiment 1]

Fase2:

[Redacted content for Fase2]

Experiment 2.

[Redacted content for Experiment 2]

Experiment 3.

[Redacted content for Experiment 3]

Experiment 4.

[Redacted content for Experiment 4]



**Experiment 5.**

[Redacted text for Experiment 5]

**Experiment 6.**

[Redacted text for Experiment 6]

**Experiment 7.**

[Redacted text for Experiment 7]

**Experiment 8**

[Redacted text for Experiment 8]

**Experiment 9.**

[Redacted text for Experiment 9]

[Redacted text block]

**Experiment 10.**

[Redacted text block]

**Fase 3:**

[Redacted text block]

**Experiment 11.**

[Redacted text block]

**Experiment 12.**  
[Redacted text block]

**Experiment 13.**

Animal amount needed in each Fase has been summarized in the table below. Particularly, in Fase 3, female animals used for breeding are included while male animals are excluded in the calculation of the total experimental animals.

| Fase   | Animal number                              |                     |
|--------|--|---------------------|
| Fase 1 | 150  |                     |
| Fase 2 | 726  |                     |
| Fase 3 | 386  | 255 pups            |
|        |  | 104 dams            |
|        |  | 27 moms for milk    |
|        | 57 (excluded from the total number)        | 57 males for mating |
| Total  | 1262                                       |                     |
| Total  | 1319 taking 5% non responders into account |                     |

In addition we think it is necessary to take [redacted] Non-responders' into account, since it is known that an estimated 5% of mice may not respond to vaccination. Therefore, extra mice will be required (total mice,  $1262 + 1262 \times 5\% = 1319$  mice in total). In total, we need  $1319$  mice +  $116$  (breeders) =  $1430$  mice for this 5-year project.

**B. The animals**

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

1319 mice C57Bl/6J0laHsd mice will be used in total (see the first table about how the number is built-up). Since the methods for establishment of vaccination model for this species are well established in both genders, we intend to use a total of 876 6-week-old mice and 255 neonatal mice (7-day-old) requiring 104 9-week-old female breeders (male mice for breeding are not included in this calculation) and 27 milking moms. And 57 extra mice are needed because 5% of the mice may be non-response [redacted]. In case a component or in vitro identified immune response is gender specific we will indicate this in the working protocol. In order to reduce the possible long co-housing stress of male mice we will co-house them in groups of max 5 mice per cage.

| Fase   | Animals (n) |                     |
|--------|-------------|---------------------|
| Fase 1 | 150         |                     |
| Fase 2 | 726         |                     |
| Fase 3 | 386         | 255 pups            |
|        |             | 104 female breeders |
|        |             | 27 milking moms     |
| Extra  | 57 males    |                     |
| Total  | 1319        |                     |

| Species             | Origin | Maximum number of animals | Life stage   |
|---------------------|--------|---------------------------|--|
| C57Bl/6J0laHsd mice | Harlan | 1319                      | 6-week-old<br>9-week old breeders<br>7 day old Neonatal 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:** Unfortunately, replacement is not possible. Mammals (instead of less complex animals) are needed to allow translation to humans. The effect of the dietary intervention can't be examined other than in the intact laboratory animal. A good [redacted] response and the effects of breast milk specific components on immune response is the result of complex processes in the body, wherein the immune system and the intestinal tract play a major role. In this research the interaction between the intestinal tissue (direct contact with the food) and immune cells is essential, therefore the research can't be conducted in humans or only on cell systems or using mathematical computer models.

**Reduction:** A Negative control group is necessary to demonstrate the specificity of [redacted] induced responses; however these groups will never be used for statistical comparison to supplemented groups. Therefore in each experiment, we will use only 3 mice instead of 9 mice in each sham group, which will save 7 mice per experiment. Another important way to reduce animal use is to standardization of the experiment, due to our rich experience and knowledge for establishing the [redacted] model and accurately measuring the immune development, it allows to decrease the between-experiment variation of treatment effects and reduce the need repeatedly to perform the same experiments and will therefore contribute to a reduction of the use of animals. In addition, this

experiment has been divided into several sub-studies

Therefore sub-potent combinations will be skipped.

**Refinement:** DTH setting will be performed under isoflurane anaesthesia. Euthanasia (cervical dislocation) instead of injection of overdose pentobarbital will be performed after the experiment in order to avoid second injection on mice, which increases pain and stress to the animals.

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

No effect on weight is expected, Only if mice are losing weight (see rib bow) we will start to weigh mice more frequently (at least 1x per 2days). The body weight will be measured each week. All animals are killed by cervical dislocation under isoflurane anaesthesia at the end of the experiment or in case change in weight as >20% during the entire experiment. This is done in a quick and humane way, which limits the impact on animal welfare to a minimum.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question 1.

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

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

Yes

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

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

no other adverse effects on the animals' welfare may be expected

Explain why these effects may emerge.

.

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

### J. Humane endpoints

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

No > Continue with question K.

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

General clinical signs are observed during the experiments (appearance, gait, mobility, fur condition, etc.) to assess the well being of the animals. When animal show signs of severe discomfort (not expected) and the change in weight as >20% during the entire experiment, animals are euthanized).

Indicate the likely incidence.

Likely incidence <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 – since these experiments require limited handling, two s.c. injections one i.d. injection under isoflurane anaesthesia and isoflurane anaesthesia at the end of the experiment. No weight loss or other discomfort is expected, therefore the experiments are regarded mild

**End of experiment**

**L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No > Continue with Section 3: 'signatures'.

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

All animals will be killed at the end of the experiment by cervical dislocation, before which Isoflurane anesthesia will be given to animals. A good response and the effects of breast milk specific components on immune response is a result of complex processes in the body, wherein the immune system and the intestinal tract play a major role. In this research the

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 number : 2015.II.243.038

Title project : Study of dietary intervention with human milk oligosaccharides in order to improve immune development.

Researchers : [redacted]

Faculty / Division/ Department : [redacted]

Animals used : mice, C57BL6/J

E-mail: [redacted]

Goal of the project :

The effective working of the immune system can be studied by measuring DTH (Delayed Type Hypersensitivity) reactions (ear thickness) induced by vaccination. The immune system is fully developed in adults but is still in development in infants. Numerous positive health benefits are associated with breast-feeding including reduced risk for infections, reduced development of autoimmunity like type-1-diabetes and reduced onset of allergies. Human milk is therefore not only a comprehensive source of nutrition, it is also a well-established immune-factor helping immune defence against many different infections and diseases. In this project the effects of nutritional intervention will be studied on the development and stimulation of a healthy immune system. The capability to give a good immune response [redacted]

[redacted] The project is divided in several sub-goals:

Within this research program we will study [redacted]  
[redacted] HMOS are a family of structurally diverse unconjugated glycans that are highly abundant in and unique to human milk. The composition of human milk varies extensively between individuals and time of feeding). [redacted]

Therefore during the project, 5 main research questions will be addressed:

Research question 1: [redacted]

Research question 2: [redacted]

Research Question 3: [redacted]

Research question 4: [redacted]

Research question 5: [redacted]

[redacted]



protocol:

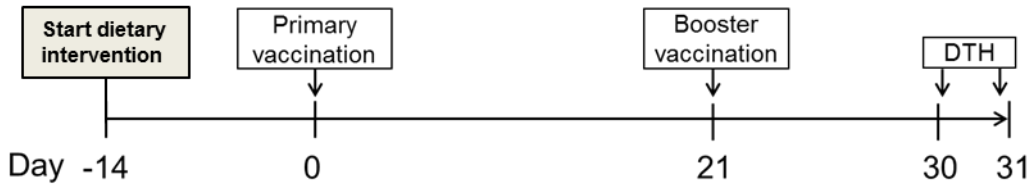


Figure 1.

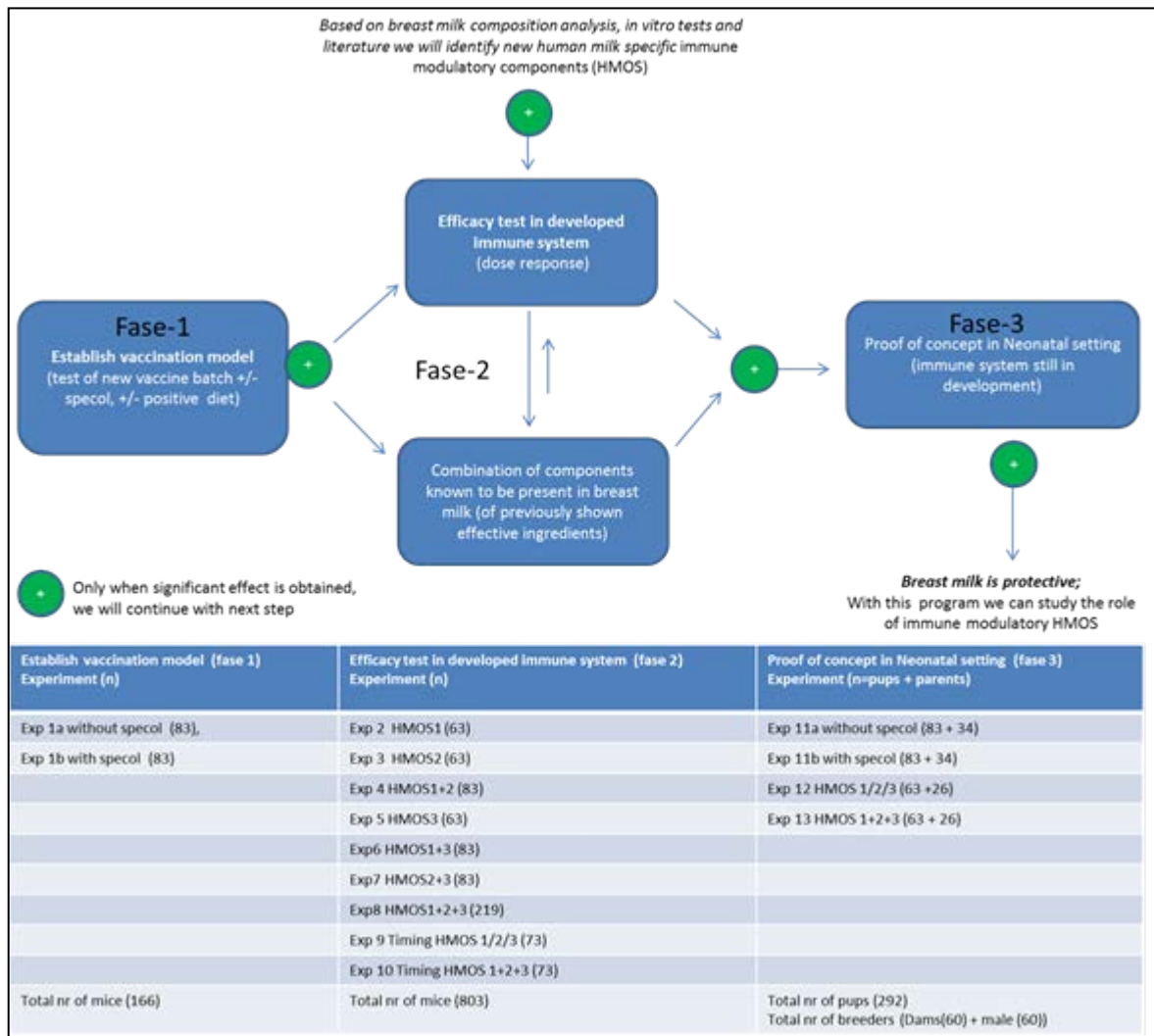
by two sub cutaneous (s.c.) injections with [REDACTED]. In the negative control group, the mice do not get any sub cutaneous injection. The study is build up in 3 phases (see schema below) and only whether significant effects will be obtained, next phase will be followed. That means for the setup that in the design of 13 experiments, groups will be repeated to get in the end reliable results. Therefore, the design of experiment 1 is taken as a model for the others and only the effect of the diet intervention on the [REDACTED] response has been taken in account in the calculations as a base for the following experiments.

*Explanation and Calculation:* For calculating the *sample size* we postulate our primary question:

[REDACTED]

To answer this question, an ANOVA statistical test suits the best to calculate the number of mice that are needed per experimental group to get a relevant difference in our treated groups. Therefore, the power analysis is based on several choices:  $\alpha = 0.05$  and the power =  $(1 - \beta) = 0.95$ . These choices are based on:

- 1) In our research field it is usual that  $\alpha$  is equal or less than 0.05 (Type I error as small as possible) and the power is high so that we may reject our null-hypothesis with a probability as big as possible that the control groups are equal to the experimental groups.
- 2) In this way we will generate reliable data with our valuable animals.
- 3) The reproducibility is strongly increased because of our experience gathered over a number of years with these kind of experiments, and therefore sigma ( $\sigma$ ) can be kept as small as possible.
- 4) These statistical choices will lead to refinement of our experiments and numbers of animals needed for our experimental groups can be decreased, whereby we still can perform reliable experiments.
- 5) That means, on base of experience, for negative controls (sham groups; not taken in account in the statistical calculations)  $n=3$  mice are sufficient to have a good basic for normal [REDACTED]
- 6) One way ANOVA is chosen in our model, based on previous work published in the International Immunopharmacology 6 (2006) 1277–1286: A specific prebiotic oligosaccharide mixture stimulates delayed-type hypersensitivity in a murine influenza vaccination model by Arjan P. Vos et al. Therefore, we like to follow the choice according to the article in which statistical differences between test and control groups will be analyzed by ANOVA and post hoc Dunnett's test if multiple groups are compared to a single (control) group. Bonferroni post hoc tests will be performed after ANOVA if comparisons are made to multiple groups. A significant result of increased DTH response between test and control group will be enough to go to the next phase. So, for experiment 1 a and b [REDACTED]



By use of the computer program “G\*Power” we calculated the needed numbers of animals (*n*) per experimental group, depicted to be able to perform reliable statements and get biological relevant differences between DTH groups and experimental diet-treated groups regarding the several parameters that will be measured in these experiments.

[Redacted]

(This calculation program has been downloaded via: <http://www.gpower.hhu.de> , Version 3.1.9.). The final number of 10 animals per experimental group as the come-out is a temporary estimate and before the start of the following experiments a recalculation is conducted (because of changed circumstances, variations are induced and can have influence on the numbers of animals needed per group) in consultation with the Animal Welfare Body.

In the program we filled in under sheet **Test Family: F tests**

Under sheet **Statistical Test: ANOVA: Fixed effects, omnibus, one way**

Under sheet **Type of power analysis:**

**A priori: Compute required sample size – given  $\alpha$ , power and effect size**

The effect size in this case is the ratio of "minimum expected relevant difference between the 4 dose groups and the control DTH group" and "the standard deviation within a group".

|                 | DTH (increased ear thickness (um)) | Relevant difference (=increased DTH) | Numbers (n) |
|-----------------|------------------------------------|--------------------------------------|-------------|
| Vaccination     | 243                                |                                      | 10          |
| HMOS (dose1)    | 269                                | minimal relevant difference = 10%    | 10          |
| HMOS (dose 2)   | 294                                | 20%                                  | 10          |
| HMOS (dose 3)   | 329                                | 35%                                  | 10          |
| HMOS (dose 4)   | 302                                | 25%                                  | 10          |
| SDwithin groups | 45.6                               |                                      |             |
| Effect size     | 0.649                              |                                      |             |
| alpha           | 0.05                               |                                      |             |
| power           | 0.95                               |                                      |             |

We estimated the increased DTH responses on base of previous work in our group

. In this article it is published that the effect of dietary intervention causes a N-shaped effect, with 1 optimal dose, that will be the dose when the difference between the ear thickness of the test group and the control vaccination group is the highest. According to figure 2 in mentioned article and former data within our department group, differences will reach a maximum of 35% and will vary from 10 till 25% increased ear thickness compared to control DTH response. In this study we like to follow the line of calculations that statistical differences between test and control groups will be analyzed by ANOVA and post hoc Dunnett's test if multiple groups are compared to a single (control) group. Bonferroni post hoc tests will be performed after ANOVA if comparisons are made to multiple groups.

#### Out-come of G\*Power program:

[1] -- Wednesday, November 18, 2015 -- 11:28:58

F tests – ANOVA: Fixed effects, omnibus, one-way

Analysis: A priori: Compute required sample size

Input: Effect size f = 0.6486188  
 $\alpha$  err prob = 0.05  
Power (1- $\beta$  err prob) = 0.95  
Number of groups = 5

Output: Noncentrality parameter  $\lambda$  = 21.0353174  
Critical F = 2.5787392  
Numerator df = 4  
Denominator df = 45  
Total sample size = 50  
Actual power = 0.9538260

**Conclusion:**

In conclusion: regarding alpha error of 5% and a discernment of 95% there will be an effect of minimal 10% enhancement of the immune system in (diet-)supplemented groups when we will take 10 animals per group. On base of experience and literature, the negative control groups (sham) will be set on n=3 mice per group.

Experiment 1a + 1b is a go or no-go experiment and

Because of the high variation, the number of 10 animals per experimental group is a temporary estimate and before the start of following experiments a recalculation is conducted in consultation with the Animal Welfare Body.

### **A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2015.II.243.038
2. Titel van het project : Study of dietary intervention with human milk oligosaccharides in order to improve immune development
3. Titel van de NTS : Effect van voeding op de ontwikkeling van een gezond afweersysteem

#### 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

#### 5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht  
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247  
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

#### 6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 20-11-2015  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 02-12-2015 en 13-01-2016  
 anderszins behandeld:  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 14-12-2015 tot 23-12-2015  
21-01-2016 /27-01-2016 tot 02-02-2016  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 02-03-2016

#### 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: 14-12-2015
- Strekking van de vraag / vragen:

### Aanvraagformulier projectaanvraag

- U hebt hier de eerste geldstroom ingevuld. De DEC heeft echter het vermoeden dat het gaat om de vierde geldstroom. Graag toelichten en eventueel aanpassen.

### Niet Technische Samenvatting

- 3.1, beschrijving doelstellingen: De DEC verzoekt u beter te beschrijven wat precies het doel is van dit project (zie ook 3.1 van het projectformulier). Graag het hele stuk herschrijven.
- 3.4, verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdierendieren: Hier wordt de indruk gewekt dat aan het einde van de proef de zwelling op de injectieplaats gemeten wordt. Dit is naar de mening van de DEC feitelijk onjuist.

### Projectvoorstel

- 3.1, achtergrond: Het valt de DEC op dat u eerst beargumenteert, onder verwijzing naar een aanbeveling van de WHO, dat het geven borstvoeding belangrijk is. Uit het vervolg wordt echter niet duidelijk waarom het dan toch belangrijk is om het product met HMOS waar het in deze aanvraag over gaat te ontwikkelen. Het is nu onvoldoende duidelijk waarom dit nodig is, gezien het feit dat borstvoeding de eigenschappen heeft die u zoekt. Graag het verhaal logischer maken, ook in de NTS, zodat de lezer begrijpt waarom het toch nodig is een ander product te ontwikkelen.
- 3.1, achtergrond: Uit de achtergrond lijkt duidelijk te worden dat het u gaat [REDACTED], iets dat in veel gevallen ook een probleem is als er wel borstvoeding wordt gegeven. Graag ook dit zo opschrijven dat het logisch aansluit bij de lijn van uw verhaal.
- 3.1, achtergrond: De DEC verzoekt u de laatste zin uit de achtergrond te verwijderen of te verplaatsen naar 3.2. Graag aanpassen.
- 3.2, doel: De DEC raadt u aan de genoemde subvragen te verplaatsen naar 3.4. In feite zijn het namelijk stappen in uw onderzoeksstrategie die beter passen voorafgaand aan het schema in 3.4.
- 3.2, doel: De DEC verzoekt u na de eerste alinea een toelichting te geven over de haalbaarheid van de doelstellingen van de studie (dit wordt namelijk expliciet gevraagd: explain why this objective is achievable).
- 3.2, doel: Als u meent dat [REDACTED] Als u dat niet doet, waarom dan niet?
- 3.3, belang: Het wordt onvoldoende duidelijk waarom het belangrijk is om dit product te ontwikkelen, terwijl borstvoeding eerste keus is. Graag beter onderbouwen.
- 3.4 onderzoeksstrategie, 3.4.2, fase 2: De DEC verzoekt u de eerste zin (Previous studies...) ook in 3.1 te noemen, ter verduidelijking.

- 3.4, onderzoeksstrategie: De DEC verzoekt u te noemen dat uit eerder onderzoek met muizen bekend is dat wanneer moeders oligosacchariden krijgen, dit een meetbaar effect heeft op de pups.
- 3.4, onderzoeksstrategie: [REDACTED]  
[REDACTED], graag preciezer formuleren wat u hier bedoeld.

#### Bijlage

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC verzoekt u aan te geven of de moeders ook worden opgevoerd als proefdieren.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters, breeding protocol: De DEC verzoekt u een apart schema te maken van de proef waarbij duidelijk wordt wanneer de moeders HMOS krijgen en vervolgens wanneer melkmonsters worden afgenomen.
- B. De Dieren: U komt in uw berekening uit op 1487, in plaats van de hier door u genoemde 1500. Graag toelichten of en waarom de overige 13 dieren gebruikt worden. Tevens vraagt de DEC zich af of de 30 moeders waarvan melkmonsters worden afgenomen zijn opgenomen in dit getal. Tenslotte merkt de DEC op dat de mannelijke dieren die gebruikt worden voor het fokken, niet opgenomen hoeven te worden als proefdier.
- J. Humane eindpunten: Onder D noemt u het wege van de dieren, maar dit komt niet terug in J. Graag in beide punten noemen of helemaal weglaten. Als u ervoor kiest dit te noemen, dan ook graag een criterium opnemen (bv. ...>15% gewichtsverlies in twee dagen of >20% over de gehele proef). Graag aanpassen.
- L. Wijze van doden: De DEC verzoekt u de anesthesie op te nemen in de tekst.

#### Extra bijlage

- U gebruikt voor de powerberekening een power van meer dan 90%. De DEC aanvaardt over het algemeen een power tussen de 80-90%. Graag motiveren waarom u een hogere power aanhoudt.
- Het is de DEC niet duidelijk waarom een [REDACTED] [REDACTED]. Is dit op enigerlie wijze gevalideerd? Graag toelichten.
- De DEC verzoekt u voortaan geen extra bijlagen meer mee te sturen met informatie die eigenlijk gewoon in de aanvraag thuishoort. Een extra bijlage dient u alleen te gebruiken voor informatie (bijvoorbeeld een schema) die om praktische redenen niet in de aanvraag opgenomen kan worden (past niet in de layout; instellingen van het Worddocument laten het niet toe etc.)
- Datum antwoord: 23-12-2015
- Strekking van het (de) antwoord(en):  
Aanvraagformulier projectaanvraag



- Door de samenwerking met [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

#### Niet Technische Samenvatting

- 3.1, beschrijving doelstellingen: NTS 3.1 en 3.2 zijn geheel herschreven zie NTS
- 3.4 Negatieve gevolgen voor welzijn van de proefdieren: Muizen krijgen 2x een onderhuidse injectie met daarin een [REDACTED] (deze wordt op de rug geplaatst en is inderdaad niet de plaats van de zwelling meting). Net als bij de mens geeft dit geen bijwerkingen, behalve misschien een kleine zwelling. Aan het einde van de proef wordt de [REDACTED]  
[REDACTED]  
[REDACTED]

In NTS 3.4 is deze toelichting verwerkt.

#### Projectvoorstel

- 3.1, achtergrond: We will include the notification that although UNICEF as well as the WHO recommend breastfeeding, it is still less known what the individual contribution of breast milk specific components is to the development of the immune system. Moreover, with the obtained knowledge on the individual specific components present within breast milk, it will be possible to improve formula for infants who cannot be provided with breast milk for any reason.  
= Added to the text to 3.3-page 4
- 3.1, achtergrond: In addition we will make clear that: The development of the immune system is dependent on several environmental factors including the microbiome. This interaction has an impact on the efficiency of the [REDACTED] response, which is an aspect of relevance to study also when breastfeeding is provided  
= Added to the text to 3.1-page 2.
- 3.1, achtergrond: The last sentence from the background is removed.
- 3.2, doel: The effect of HMOS on the immune system [REDACTED]  
[REDACTED] Therefore we have indicated within the protocol, that at several time points fecal samples will be collected.
  - The influence of the Microbiome is mentioned in the hypothesis and added to appropriate research questions to 3.2-page "3"
- 3.3, belang: Although provision of breastfeeding remains first choice, it is less known what the individual contribution of breast milk specific components is to the development of the immune system. Moreover, with the obtained knowledge on the individual specific components present within breast milk, it will be possible to improve formula for infants who

cannot be provided with breast milk for any reason. In addition, obtained knowledge may in the future also be used to support people with failing or reduced immune capacity.

-Added to 3.3 –page “4”

- 3.4, onderzoeksstrategie: The first sentence in 3.4.2, fase 2: (previous studies.....) is added to section 3.1 for clarification.
- 3.4, onderzoeksstrategie: We included two references that the supplementation with oligosaccharides in female mice has a measurable effect on the pups. For example, in an allergic asthma mouse model, the measurable effects in the offspring whose mothers were fed with scGOS/lcFOS/pAOS during pregnancy have been shown by Hogenkamp et al (Hogenkamp, 2015). Similar effects have also been detected on the pups from oligosaccharides-fed mothers (Reiko 2010).

= Added to 3.4.2-page 6 and also reference is added to “references”-page 9.

- 3.4, onderzoeksstrategie: [REDACTED]

[REDACTED]

We rephrased and added info to 3.4 – page “6”

#### Bijlage

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: The mothers are included within the animal numbers although they will not receive [REDACTED]. As stated in the protocol by adding “female animals used for breeding are included while male animals are excluded in the calculation of test animals.” to A – page “11”.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters, breeding protocol: Within experiment 12, three groups are added in order to analyze the mice milk. And a separate diagram of the test in which when mothers get HMOs and then when milk samples are taken is provided by adding “Figure 2” to A – page “3”.
- B. De Dieren: In our final calculation we request to use an exact total of 1460 mice:
  - 166 mice for Fase 1
  - 803 mice for Fase 2
  - 428 mice for Fase 3 (including, 282 pups, 116 female breeders, 30 moms for milk samples, excluding the male breeders). 63 extra mice are included taken into account that 5% of the mice may be non-response to vaccination according to our experience and literature. A table indicating the detail of animal amount is added to the text to A – page “8”. The 58 male animals for breeding, who will not be vaccinated, will not be included as experimental animals, but will be mentioned within the protocol, as indicated above.
- J. Humane eindpunten: We did not mention weight change as marker for humane end point as we do not expect a drastic change in weight during any of the procedures. However to be

more consistent throughout the protocol, we will include the change in weight as >20% during the entire experiment as criteria.

-Added to the text as "the change in weight as >20% during the entire experiment, animals are euthanized" to J-page "11".

- L. Wijze van doden: The use of Isoflurane anesthesia prior to the end of the experiment is added to the text as "All animals will be killed at the end of the experiment by cervical dislocation, before which Isoflurane anesthesia will be applied to animals." to L- page "11".

#### Extra bijlage

- Since expected relevant changes will be expected to be small changes (i.e. down to 10%), we would like to use the high power in order to optimize the chance of finding a significant difference between the groups.

In previous studies it is shown that optimal individual interventions can have effects up to 40%, we consider 1/4th of this optimal effect already one to be of relevance to further investigate. (Vos et al 2007)

- Since the statistical calculation and support to the program required input from an independent statistical expert, we did not want to withhold any of this information to the DEC. Therefore, this was provided as an additional addendum.

- Datum: 21-01-2016

Strekking van de vraag / vragen:

#### Extra bijlage

- De DEC kan zich nog niet vinden in uw argumentatie om een hogere power dan gebruikelijk te hanteren. Als u kleine verschillen verwacht, dan zal uit de powerberekening komen dat u grotere groepen dieren dient te gebruiken om tot een significant resultaat te komen. Door daarnaast ook nog met een extra hoge power van 95% te werken verhoogt u het aantal dieren nogmaals. Dit laatste is in de ogen van de DEC onnodig als daar geen goede andere argumenten voor zijn. De DEC verzoekt u de powerberekening nader toe te lichten en raadt u aan om eventueel met een statisticus te overleggen over het berekenen van de power.

- Datum: 27-01-2016

Strekking van de vraag / vragen:

#### Projectvoorstel

- 3.2. Doel: Er is niet vermeld waarom de doelstellingen in de projectaanvraag haalbaar worden geacht, terwijl dit wel wordt gevraagd. Graag toevoegen.

#### Extra bijlage:

- De DEC adviseert u om de genoemde informatie uit de extra bijlage toch nog toe te voegen/te integreren bij de desbetreffende onderdelen in de reguliere aanvraag. De

verschillende presentatie omtrent de dieraantallen in de reguliere bijlage en de extra bijlage roept mogelijk vragen op bij de CCD. In de reguliere bijlage bij onderdeel 2A is het afdoende om aan te geven welke statistische methode wordt gebruikt om het aantal dieren te berekenen. Bij onderdeel 2B moet worden vermeld wat het totale aantal dieren is en hoe dat aantal tot stand is gekomen. In de extra bijlage wordt een voorbeeld gegeven van 5 groepen met een n=10. Het is momenteel niet helder genoeg hoe deze berekening zich verhoudt met de genoemde aantallen in de reguliere bijlage, onderdeel 2B.

- Bijlage, onderdeel 2H, is onvolledig ingevuld; Graag volledig beantwoorden (dus ook het tweede deel van de vraag dat is weggefallen in de versie die de DEC heeft ontvangen).
- Datum antwoord: 02-02-2016
- Strekking van het (de) antwoord(en):  
Projectvoorstel
- 3.2, Doel: Er is niet vermeld waarom de doelstellingen in de projectaanvraag haalbaar worden geacht, terwijl dit wel wordt gevraagd. Graag toelichten: We regard the objective as achievable because: 1. Within our department, techniques for vaccinating mice have been well established [REDACTED] as well as the proposed parameters based on our experience 2. Our hypothesis (objective) is theoretically possible according to the literature and based on our current knowledge about human milk oligosaccharides.  
- Added to the text to 3.2-page 3.

#### Extra bijlage

- De DEC kan zich nog niet vinden in uw argumentatie om een hogere power dan gebruikelijk te hanteren. Als u kleine verschillen verwacht, dan zal uit de powerberekening komen dat u grotere groepen dieren dient te gebruiken om tot een significant resultaat te komen. Door daarnaast ook nog met een hogere power van 95% te werken verhoogt u het aantal dieren nogmaals. Dit laatste is in de ogen van de DEC onnodig als daar geen goede andere argumenten voor zijn. De DEC verzoekt u de powerberekening nader toe te lichten en raadt u aan om eventueel met een statisticus te overleggen over het berekenen van de power: -As suggested the statistical power calculation document has been integrated within the project proposal. In addition, We consulted a statistician and agree to use power=0.90, and changed the animal number from 10 per group into 9 per group accordingly based on the power=0.90. The corresponding numbers have also been changed in the text in A, Experimental strategy in page 5; B, The animals, page 6;
- Bij onderdeel 2B moet worden vermeld wat het totale aantal dieren is en hoe dat aantal tot stand is gekomen. In de extra bijlage wordt een voorbeeld gegeven van 5 groepen met een n=10. Het is momenteel niet helder genoeg hoe deze berekening zich verhoudt met de genoemde aantallen in de reguliere bijlage, onderdeel 2B: We stated the total number of animals as 1319 which is recalculated upon 9 mice per group. An extra table has been added in B. page 6 to state how the total number is calculated.

- Bijlage, onderdeel 2H, is onvolledig ingevuld; Graag volledig beantwoorden (dus ook het tweede deel van de vraag dat is weggefallen in de versie die de DEC heeft ontvangen). The second part of the question has been answered. –H. page 8.

#### Extra bijlage

- In de extra bijlage wordt een voorbeeld gegeven van 5 groepen met een n=10. Het is momenteel niet helder genoeg hoe deze berekening zich verhoudt met de genoemde aantallen in de reguliere bijlage, onderdeel 2B: Group size has been corrected to 9, which stick to the number per group in 2B. – Page 5
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag:

#### 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 (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

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

1. Het project is:
  - uit wetenschappelijk oogpunt verantwoord.
  - uit onderwijskundig oogpunt verantwoord.
  - uit het oogpunt van productiedoelinden verantwoord.
  - wettelijk vereist.
2. De in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstelling.
3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. Het project probeert te ontrafelen welke componenten in moedermelk bijdragen aan de ontwikkeling en stimulatie van een gezond immuunsysteem. De ontwikkeling van het immuunsysteem is afhankelijk van een aantal interne en externe factoren. [REDACTED]

[redacted]  
[redacted]  
[redacted] rol kan spelen op het microbioom en het  
immuunsysteem. Het is momenteel niet duidelijk welke specifieke componenten van de  
moedermelk de beschermende effecten teweegbrengen. [redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted] Baby's die geen of onvoldoende moedermelk  
kunnen drinken, kunnen op deze manier een [redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de  
doelstelling binnen het kader van het project. De onderzoekers beschrijven hun project in een  
drietel fases. De onderzoeksvragen behorend bij de verschillende fases zijn duidelijk  
geformuleerd en toetsbaar. Er is duidelijk aangegeven in welke volgorde de experimenten  
worden uitgevoerd binnen de fases. Bovendien wordt er pas verder gegaan met de volgende  
fase wanneer een significant positief effect is behaald uit de voorgaande fase. De 3 te testen  
specifieke componenten in moedermelk (HMOS) zijn geïdentificeerd op basis van voorgaande  
onderzoeken door dezelfde onderzoeksgroep en op basis van literatuur. [redacted]

[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted] | [redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]  
[redacted]

[redacted]. De DEC is ervan overtuigd  
dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling  
met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. In DEC nummer  
2013.II.06.070 is door de onderzoekers al veel expertise opgedaan met pasgeboren muizen.

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

- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Gefokt voor dierproeven (11)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e lid 2)
- Huisvesting en verzorging
- Locatie: instelling vergunninghouder (10g)

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

Het ongerief wordt door de onderzoekers als licht ingeschat. [REDACTED]

[REDACTED] Direct daarna wordt het dier gedood en komt niet een 2<sup>e</sup> keer bij van de anesthesie. Daarnaast worden de dieren geschoren ter identificatie en wekelijks gewogen. Het ongerief wordt door de DEC geclassificeerd als licht voor alle dieren (100%). Er wordt niet verwacht dat de experimentele handelingen zullen leiden tot een humaan eindpunt. De kans dat een humaan eindpunt wordt bereikt door onvoorziene omstandigheden, zoals gewichtsverlies van het dier, is kleiner dan 2%.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De reactie van het lichaam op de specifieke voedingscomponenten en de vaccinatie zijn het resultaat van complexe processen in het lichaam, waarbij het afweersysteem en vooral de ontstekingscellen een grote rol spelen. [REDACTED]

[REDACTED] kan het onderzoek niet bij de mens uitgevoerd worden en ook niet op celsystemen of met wiskundige computermodellen.

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 onderzoekers maken gebruik van een negatieve controlegroep van 3 dieren om te controleren of er geen zwelling in het oor optreedt, 24h na een injectie in het oor, wanneer niet vooraf 2 vaccinaties zijn gegeven. Deze negatieve controlegroep is noodzakelijk om zeker te zijn van de effecten van de 2 vaccinaties, maar hoeft niet te worden gebruikt voor statistische vergelijkingen. Op basis van eerdere ervaringen in deze onderzoeksgroep is het afdoende om 3 dieren te gebruiken in plaats van de beoogde 9 dieren berekend uit de poweranalyse, aangezien de groep niet wordt meegenomen in statische analyses na afloop van het experiment. Daarnaast wordt, omdat het experiment wordt uitgevoerd in verschillende fases, alleen de beste HMOS en de concentratie van deze HMOS gebruikt in fase 3 van het project. De DEC is van mening dat het maximaal aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en looptijd van 5 jaar.



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 onderzoeksgroep heeft ruim 15 jaar ervaring met de beschreven experimenten en verwacht op grond van die ervaring dat er tijdens het experiment geen dieren dood zullen gaan of onnodig zullen lijden. Doordat het project is opgezet in verschillende fases wordt bovendien eerst getest of de gebruikte [REDACTED] efficiënt werken. Binnen de onderzoeksgroep zijn verschillende technieken opgezet, welke telkens zijn verbeterd om de ontwikkeling van het immuunsysteem in de muizen nauwkeurig te kunnen meten. Omdat kan worden verwacht dat de injectie in de huid van het oor pijnlijk is, wordt deze injectie uitgevoerd onder isofluraan anesthesie.
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

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

Op grond van de onder C genoemde overwegingen komt de DEC tot de volgende afweging. Het beschreven project heeft als [REDACTED]

[REDACTED] De uitkomsten van dit onderzoek dragen substantieel bij aan het begrijpen van de mechanismen achter de immuunmodulerende effecten van specifieke componenten in moedermelk. [REDACTED]

[REDACTED] De DEC is van mening dat het projectvoorstel vanuit wetenschappelijk oogpunt verantwoord is en de vertaling van de onderzoeksresultaten naar de mens wordt mogelijk geacht. De gestelde doeleinden kunnen worden gehaald binnen de gevraagde termijn. De onderzoeksgroep veel ervaring heeft met de beschreven diermodellen. De DEC acht, alles overziend, het belang van dit onderzoek daarom substantieel.

Tegenover dit substantiële belang staat het gegeven dat alle dieren maximaal licht ongerief zullen ondervinden, met name als gevolg van de injecties, het bijkomen uit een kortdurende lichte anesthesie en mogelijk ook enige pijn door zwelling van het oor. De DEC is er van overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van 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 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 niet te verlenen vanwege:

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

### **Dierexperimentencommissie Utrecht**



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

[Redacted]

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD108002016460

**Bijlagen**

2

Datum 10 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 8 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002016460. 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: 10800  
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 30275924  
Straat en huisnummer: [REDACTED]  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT UTRECHT  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

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 mei 2016  
Geplande einddatum: 1 april 2021  
Titel project: Study of dietary intervention with human milk oligosaccharides in order to improve immune development  
Titel niet-technische samenvatting: Effect van voeding op de ontwikkeling van een gezond afweersysteem  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Huispostnummer D01.343, Postbus 85500,3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 935,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Utrecht

Datum:

7 maart 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU -ASC  
Postbus 80.011  
3508 TA UTRECHT  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD108002016460  
**Bijlagen**  
2

Datum 10 maart 2016  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 10 maart 2016  
Vervaldatum: 9 april 2016  
Factuurnummer: 16700460  
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

| Omschrijving   | Bedrag   |
|--|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD108002016460 | € 935,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007  
3501 AA Utrecht

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD108002016460

**Uw referentie**

Datum 12 mei 2016  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

**Bijlagen**  
1

Geachte [REDACTED]

Op 10 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Study of dietary intervention with human milk oligosaccharides in order to improve immune development" met aanvraagnummer AVD108002016460. 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 geldt de algemene voorwaarde zoals genoemd in de vergunning. U kunt met uw project "Study of dietary intervention with human milk oligosaccharides in order to improve immune development" starten. De vergunning wordt afgegeven van 12 mei 2016 tot en met 01 april 2021. De startdatum wijkt af van uw aanvraag omdat deze in het verleden ligt.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 02 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is het advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij nemen dit advies van de commissie over. 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, lid 1, is een algemene voorwaarde toegevoegd.

**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.



**Datum**

12 mei 2016

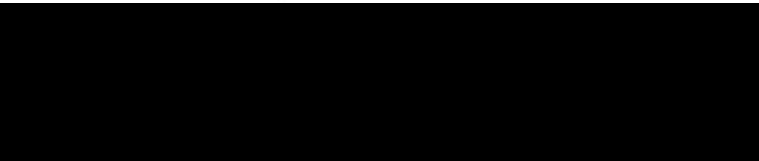
**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD108002016460

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  
namens deze:



Ir. G. de Peeter  
Algemeen Secretaris

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

**Bijlagen**

- Vergunning

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



## Projectvergunning

gelet op artikel 10a van de Wet op de dierproeven

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

deze projectvergunning voor het tijdvak 12 mei 2016 tot en met 01 april 2021, voor het project "Study of dietary intervention with human milk oligosaccharides in order to improve immune development" met aanvraagnummer AVD108002016460, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht.

De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 10 maart 2016;
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 10 maart 2016;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 10 maart;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie d.d. 02 maart 2016, zoals ontvangen op 10 maart 2016;

### Dierproeven

| Naam dierproef   | Diersoort             | Aantal dieren | Ernst |
|--|-----------------------|---------------|-------|
| 3.4.4.1. Study of dietary intervention in a vaccination model in mice. | Muizen (Mus musculus) | 1319          | Licht |

### Algemene voorwaarde

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

In artikel 10, lid 1 sub a van de wet, wordt bepaald dat het verboden is een dierproef te verrichten voor een doel dat, naar de algemeen kenbare, onder deskundigen heersende opvatting, ook kan worden bereikt anders dan door middel van een dierproef, of door middel van een dierproef waarbij minder dieren kunnen worden gebruikt of minder ongerief wordt berokkend dan bij de in het geding zijnde proef het geval is. Nieuwe onderzoeken naar alternatieven kunnen tot gevolg hebben dat inzichten en/of omstandigheden van het aangevraagde project in de vergunningsperiode wijzigen, gedurende de looptijd van deze vergunning.

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.

**Datum**

12 mei 2016

**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD108002016460

## **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 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.

**Datum**

12 mei 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD108002016460

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

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

| Inventaris Wob-verzoek W16-16S |                                   |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
|                                |                                   | wordt verstrekt |      |        |       | weigeringsgronden |        |        |      |
| nr.                            | document                          | reeds openbaar  | niet | geheel | deels | 10.1.c            | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
|                                | <b>NTS2016461</b>                 |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
| 1                              | Aanvraagformulier                 |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 2                              | Projectvoorstel                   |                 |      |        | x     |                   |        | x      |      |
| 3                              | Niet-technische samenvatting      | x               |      |        |       |                   |        |        |      |
| 4                              | Bijlage beschrijving dierproeven  |                 |      |        | x     |                   |        | x      |      |
| 5                              | DEC-advies                        |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 6                              | Ontvangstbevestiging              |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 7                              | Advies CCD                        |                 | x    |        |       |                   |        |        | x    |
| 8                              | Beschikking en vergunning         |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 9                              | Mail terugkoppeling DEC 27-5-2016 |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |

D 246002016461



13 APR. 2016

## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](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?<br><i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>                          | <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in 24600<br><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">Schothorst Feed Research B.V.</td> </tr> <tr> <td>Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde</td> <td colspan="2">[REDACTED]</td> </tr> <tr> <td>KvK-nummer</td> <td>39084732</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Straat en huisnummer</td> <td>Meerkoetenweg</td> <td>26</td> </tr> <tr> <td>Postbus</td> <td colspan="2">Postbus 533</td> </tr> <tr> <td>Postcode en plaats</td> <td>8200 AM</td> <td>Lelystad</td> </tr> <tr> <td>IBAN</td> <td colspan="2">NL24RABO0337738394</td> </tr> <tr> <td>Tenaamstelling van het rekeningnummer</td> <td colspan="2">Schothorst Feed Research B.V.</td> </tr> </table> | Naam instelling of organisatie | Schothorst Feed Research B.V. |   | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [REDACTED] |  | KvK-nummer | 39084732   |  | Straat en huisnummer | Meerkoetenweg | 26 | Postbus     | Postbus 533 |  | Postcode en plaats | 8200 AM | Lelystad | IBAN | NL24RABO0337738394 |  | Tenaamstelling van het rekeningnummer | Schothorst Feed Research B.V. |  |
| Naam instelling of organisatie                      | Schothorst Feed Research B.V.   |   |                                |                               |   |   |            |  |            |            |  |                      |               |    |             |             |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde | [REDACTED]  |   |                                |                               |   |   |            |  |            |            |  |                      |               |    |             |             |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| KvK-nummer  | 39084732  |   |                                |                               |   |   |            |  |            |            |  |                      |               |    |             |             |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| Straat en huisnummer                                | Meerkoetenweg   | 26  |                                |                               |   |   |            |  |            |            |  |                      |               |    |             |             |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| Postbus   | Postbus 533   |   |                                |                               |   |   |            |  |            |            |  |                      |               |    |             |             |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| Postcode en plaats                                  | 8200 AM   | Lelystad  |                                |                               |   |   |            |  |            |            |  |                      |               |    |             |             |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| IBAN  | NL24RABO0337738394  |   |                                |                               |   |   |            |  |            |            |  |                      |               |    |             |             |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| Tenaamstelling van het rekeningnummer               | Schothorst Feed Research B.V.   |   |                                |                               |   |   |            |  |            |            |  |                      |               |    |             |             |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| 1.3   | Vul de gegevens van het postadres in.<br><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><input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table>  | (Titel) Naam en voorletters    | [REDACTED]                    | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. | Functie   | [REDACTED] |  | Afdeling   | [REDACTED] |  | Telefoonnummer       | [REDACTED]    |    | E-mailadres | [REDACTED]  |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| (Titel) Naam en voorletters                         | [REDACTED]  | <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw.   |                                |                               |   |   |            |  |            |            |  |                      |               |    |             |             |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| Functie   | [REDACTED]  |   |                                |                               |   |   |            |  |            |            |  |                      |               |    |             |             |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| Afdeling  | [REDACTED]  |   |                                |                               |   |   |            |  |            |            |  |                      |               |    |             |             |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| Telefoonnummer                                      | [REDACTED]  |   |                                |                               |   |   |            |  |            |            |  |                      |               |    |             |             |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| E-mailadres   | [REDACTED]  |   |                                |                               |   |   |            |  |            |            |  |                      |               |    |             |             |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| 1.5   | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.  | <table border="1"> <tr> <td>(Titel) Naam en voorletters</td> <td>[REDACTED]</td> <td><input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.</td> </tr> <tr> <td>Functie</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Afdeling</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Telefoonnummer</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> <tr> <td>E-mailadres</td> <td>[REDACTED]</td> <td></td> </tr> </table>  | (Titel) Naam en voorletters    | [REDACTED]                    | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. | Functie   | [REDACTED] |  | Afdeling   | [REDACTED] |  | Telefoonnummer       | [REDACTED]    |    | E-mailadres | [REDACTED]  |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| (Titel) Naam en voorletters                         | [REDACTED]  | <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.   |                                |                               |   |   |            |  |            |            |  |                      |               |    |             |             |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| Functie   | [REDACTED]  |   |                                |                               |   |   |            |  |            |            |  |                      |               |    |             |             |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| Afdeling  | [REDACTED]  |   |                                |                               |   |   |            |  |            |            |  |                      |               |    |             |             |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| Telefoonnummer                                      | [REDACTED]  |   |                                |                               |   |   |            |  |            |            |  |                      |               |    |             |             |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |
| E-mailadres   | [REDACTED]  |   |                                |                               |   |   |            |  |            |            |  |                      |               |    |             |             |  |                    |         |          |      |                    |  |                                       |                               |  |

- 1.6 (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de persoon die er verantwoordelijk voor is dat de uitvoering van het project in overeenstemming is met de projectvergunning.

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| (Titel) Naam en voorletters | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
| Functie                     |  |
| Afdeling                    |  |
| Telefoonnummer              |  |
| E-mailadres                 |  |

- 1.7 Is er voor deze projectaanvraag een gemachtigde?

Ja > *Stuur dan het ingevulde formulier Melding Machtiging mee met deze aanvraag*

Nee

## 2 Over uw aanvraag

- 2.1 Wat voor aanvraag doet u?

Nieuwe aanvraag > Ga verder met vraag 3

Wijziging op (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn  
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.2

Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn  
Vul uw vergunde projectnummer in en ga verder met vraag 2.3

- 2.2 Is dit een *wijziging* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor verleend is?

Ja > Beantwoord dan in het projectplan en de niet-technische samenvatting alleen de vragen waarop de wijziging betrekking heeft en onderteken het aanvraagformulier

Nee > Ga verder met vraag 3

- 2.3 Is dit een *melding* voor een project of dierproef waar al een vergunning voor is verleend?

Nee > Ga verder met vraag 3

Ja > Geef hier onder een toelichting en ga verder met vraag 6

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?

Startdatum 1 - 5 - 2016

- 3.2 Wat is de titel van het project?

Einddatum 1 - 5 - 2021

Het ontwikkelen van voerstrategieën en het testen van additieven die de gezondheid van melkvee ondersteunen

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

Het ontwikkelen van voer strategieën en testen van supplementen die de gezondheid van melkvee ondersteunen

- 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

## 4 Betaalgegevens

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

|                                     |  |      |
|-------------------------------------|--|------|
| <input checked="" type="checkbox"/> | Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935,00 | Lege |
| <input type="checkbox"/>            | Wijziging €                                | Lege |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Via een eenmalige incasso                  |      |
| <input type="checkbox"/>            | Na ontvangst van de factuur                |      |

## 5 Checklist bijlagen

- 5.1 Welke bijlagen stuurt u mee?

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

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag

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

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

|              |               |
|--------------|---------------|
| Naam         | [Redacted]    |
| Functie      | [Redacted]    |
| Plaats       | Lelystad      |
| Datum        | 14 - 3 - 2016 |
| Handtekening | [Redacted]    |





## Format

### Projectvoorstel dierproeven

- Dit format gebruikt u om uw projectvoorstel van de dierproeven te schrijven
- Bij dit format hoort de bijlage Beschrijving dierproeven. Per type dierproef moet u deze bijlage toevoegen.
- Meer informatie over het projectvoorstel vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](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.
- 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 'hogere onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

Er is momenteel veel druk om het gebruik van antibiotica in de dierhouderij te verlagen. Daarom is er veel vraag naar producten en concepten die de gezondheid (en de vruchtbaarheid welke daar mee samenhangt) van dieren kunnen ondersteunen. In de markt zijn veel additieven beschikbaar waarvan door producenten een positief effect op gezondheid wordt geclaimd. Hieronder vallen bijvoorbeeld gisten, enzymen, aminozuurpreparaten, anionische zouten en vitamines en mineralenpreparaten. Deze additieven/ toevoegmiddelen kunnen rechtstreeks aan het dier gevoerd worden, ofwel aan ruwvoerders toegevoegd worden met als doel om de kwaliteit of benutbaarheid van ruwvoer te verbeteren. Daarnaast kunnen ook voer strategieën zoals grondstoffen keuze (o.a. verteerbaarheid, anti nutritionele factoren, vezels) en de nutriënt verhoudingen (o.a. energie: eiwit verhouding, type energie en eiwit, aminozurenprofiel) in het voer een rol spelen bij de ondersteuning van de gezondheid van rundvee.

Tijdens een paar periodes van de lactatie van melkkoeien is er een extra risico dat deze dieren problemen met hun gezondheid krijgen. Dit zijn dan ook de periodes in de lactatie van de koe waarin de meeste antibiotica gebruikt worden. Gezien de huidige regelgeving met betrekking tot antibioticagebruik (SDa, autoriteit diergeneesmiddelen) is het van belang om de advisering m.b.t. rantsoenen en additieven juist in deze periodes te optimaliseren.

De eerste periode tijdens de lactatie van de koe welke extra risico's oplevert met betrekking tot de gezondheid, is de transitieperiode. De transitieperiode van de koe wordt gedefinieerd als de periode rondom het afkalven van de koe. Transitiekoeien ondergaan een verandering van niet lactierend (droogstand) naar lactierend toe op het moment van afkalven. Deze dieren hebben een enorme uitdaging om hun Calcium en Fosfor homeostase te handhaven (Goff 2000). De koeien die daarin niet slagen hebben een groot risico om klinische ofwel subklinische melkziekte te ontwikkelen. Omdat Calcium belangrijk is voor de spierfunctie van het dier, heeft een disbalans van Calcium vooral consequenties voor alle organen welke zijn opgebouwd uit spierweefsel. Klinische melkziekte kan levensbedreigend zijn indien niet tijdig behandeld. Subklinische melkziekte geeft aanleiding tot suboptimaal functioneren van spieren: Effecten kunnen dan ook gezien worden op het niveau van bijvoorbeeld bewegingsapparaat, maag-darmkanaal en baarmoeder, welke allemaal spierweefsel bevatten. Gevolgen worden in eerste instantie gezien in de vorm van een verlaagde voeropname. Deze verlaagde voeropname leidt tot een verlaagde / negatieve energiebalans en maakt koeien kwetsbaar voor secundaire metabole aandoeningen zoals bijvoorbeeld slepende melkziekte en leververvetting (Tesfa et al. 1998). Ook problemen op het gebied van baarmoederontstekingen, aan de nageboorte blijven staan en uiergezondheidsproblemen door een verminderde functie van het immuunapparaat (Bradford et al. 2015), spelen in deze periode van de lactatie een belangrijke rol. Hierbij speelt ook het rantsoen meteen na afkalven een belangrijke rol (van Knegsel et al. 2007). Problemen welke ontstaan in de periode rondom afkalven zijn ook vaak van grote invloed op de vruchtbaarheid van de melkkoe. Wanneer het functioneren van spieren bij koeien suboptimaal is als gevolg van (subklinische) melkziekte, kan ook de baarmoedercontractie verminderd zijn. Dit leidt vaak tot een verminderde uitdrijving van lochia (bloed, slijm, cellen) na het afkalfproces, en daarop volgend een (subklinische) baarmoederontsteking. Deze gaat gepaard met een gewijzigde pH in de baarmoeder. Dit geheel heeft een negatieve invloed op de innesteling van een embryo. Problemen op het gebied van de energiebalans geven aanleiding tot problemen op het gebied van eicel (follikel) ontwikkeling en functioneren van de eierstokken. De negatieve invloed van een problematische transitieperiode op de vruchtbaarheid van de koe kan dan ook langdurig van invloed blijven op het functioneren van de melkkoe.

Voor de calciumhomeostase zijn vooral de bijnierschilddklier en de schildklier belangrijke organen. De reactie van verschillende doelorganen zoals darm, bot en nier op de hormonen die door deze klieren geproduceerd worden is afhankelijk van meerdere factoren. Om het reactievermogen van het lichaam op het geproduceerde Parathormoon (PTH) vanuit de bijnierschilddklier te verhogen, worden in eerste instantie rantsoenfactoren geoptimaliseerd. Hierbij kan men denken aan een beperking van de opname van Calcium tijdens de droogstand door de koe, de toepassing van anionische zouten (Grunberg 2011) zodat de kation-anionbalans (en daardoor de metabole pH) verlaagd wordt, en het optimaliseren van verhoudingen tussen mineralen zoals Calcium en Fosfor (Peterson et al. 2005). Naast aanpassingen die betrekking hebben op macromineralen gehalten, is ook de samenstelling van het rantsoen voor wat betreft energie en eiwitten van belang. In vele onderzoeken is reeds aangetoond dat de hoeveelheid

verstreckte energie tijdens de droogstandperiode van grote invloed is op het functioneren van de koe rond het afkalven en tijdens de start van de lactatie (Grummer 2011). Vooral een overmatige conditie op het moment van afkalven kan problemen opleveren aan het begin van de lactatie (Drackley 2005). Koeien met een te hoge conditiescore zullen bij een negatieve energiebalans vet vanuit hun lichaamsreserves mobiliseren, wat aanleiding geeft tot een verhoogd gehalte aan NEFA's (Non Esterified Fatty Acids). NEFA's kunnen de immuunstatus van koeien negatief beïnvloeden (Bradford 2015).

Nationaal en internationaal is reeds veel onderzoek uitgevoerd op het gebied van droogstand voeding. Echter tot op heden blijft de periode rondom het afkalven nog steeds een periode waarin vele problemen bij rundvee gezien worden.

Daarbij komt dat nutritionele samenstellingen van (ruw) voeders veranderen als gevolg van milieumaatregelen zoals bemestingsregels voor grasland. Verhoudingen in macromineralen en ook eiwitgehalten in droogstand rantsoenen (welke vaak voor een aanzienlijk deel bestaan uit gras (silage)) veranderen daardoor door de jaren heen.

Een tweede kritieke periode bestaat uit de laatste twee maanden van de dracht van de koe. Tijdens deze periode wordt de ontwikkeling en gezondheidsstatus van het ongebooren kalf beïnvloed. Ook de samenstelling van colostrum na het afkalven wordt beïnvloed door middel van rantsoenen tijdens de laatste maanden van de dracht. In onderzoek (van Amburgh et al. 2014; Kaske et al., 2010, Bach 2011) wordt steeds meer aandacht geschonken aan metabole programmering. Metabole programmering wordt gedefinieerd als het fenomeen waarbij een nutritionele stimulus die tijdens een belangrijk moment in de ontwikkeling van het dier – met name tijdens de intra-uteriene en vroeg postnatale fase- optreedt, gedurende het verdere leven van het individu een bepaalde invloed blijft uitoefenen. Daarom is het van belang om onderzoek te doen naar methoden om de ontwikkeling van het kalf in de baarmoeder te optimaliseren en daarnaast om de mogelijkheden van de koe te optimaliseren om een kwalitatief hoogwaardige biest te produceren. Met behulp van deze hoogwaardige biest, waarin hoge gehalten aan immuunglobulines, maar ook eiwitten, energie, prolactine, insuline en andere hormonen en voedingsstoffen aanwezig zijn, kan de opstart van het kalf verbeterd worden. Hierdoor zal een kalf in de eerste levensfase een hogere immuunstatus / weerstand hebben, maar is het daarnaast mogelijk dat een dergelijk kalf meer voedingsstoffen vanuit de kunstmelk kan opnemen en in het latere leven voor wat betreft zowel gezondheid, vruchtbaarheid en productie beter gaat presteren.

Een derde periode in de lactatie van de koe die van groot belang is voor de gezondheid en het welzijn van de koe is de periode waarin het dier drooggezet wordt. Dit is de periode waarin de koe een overgang maakt van (een vaak nog aanzienlijke) melkproductie naar een periode waarin het dier niet gemolken wordt en het uierweefsel tot rust komt. Aan het einde van de lactatie dient de koe voorbereid te worden op de droogstand periode.

Het terugdringen van de toepassing van antibioticum in de melkveehouderij is in hoge mate van belang in de periode waarin de koe de droogstand ingaat. De antibiotica die in droogzetters gebruikt worden, vormen nog steeds het overgrote aandeel van de dierdagdoseringen bij melkkoeien. Begin 2012 heeft de overheid bepaald dat in de bijsluiters van in Nederland geregistreerde antimicrobiële middelen de indicatie "preventief" geschrapt moest worden. Op basis daarvan mogen antimicrobiële middelen voor het droogzetten alleen nog maar curatief worden toegepast, dus bij het behandelen van intramammaire infecties. In de richtlijn "antimicrobiële middelen bij het droogzetten van melkkoeien" (KNMvD 2013) is de methode beschreven waarmee de toepassing van antibioticum bij droogzetten van melkkoeien verder moet worden beperkt. Dieren mogen alleen nog antibioticum krijgen als wordt voldaan aan criteria die ontleend zijn uit onderzoek gedaan door [REDACTED] (Selectief droogzetten bij melkvee). Hierbij wordt gekeken naar de hoogte van het celgetal in de periode voor het droogzetten van de koe ofwel uitkomst van diagnostiek m.b.t. actuele uierinfecties. Net als bij de overgang van droogstand naar lactatie is ook de overgang van lactatie naar droogstand een risicovolle periode voor de koe voor uiergezondheid. Beperkt gebruik van antibioticum leidt tot een hoger risico op het ontstaan van mastitis tijdens droogstand en vroege lactatie. Om dit risico te verminderen is een goede droogzetstrategie van groot belang. Een goede droogzetstrategie kan bestaan uit een geleidelijke vermindering van de melkproductie tot het moment van droogzetten. Op het moment van droogzetten wordt de koe niet meer gemolken en dient het slotgat van de speen te sluiten om te fungeren als barrière tegen het binnendringen van bacteriën. Het optimaliseren van de droogzetperiode kan bestaan

uit voer strategieën waarmee de melkproductie aan het einde van de lactatie wordt verminderd (Odensten et al. 2007; Tucker et al. 2009). Daarnaast kan men ook denken aan mogelijkheden tot optimalisatie van voeding/management die van invloed zijn op het ontstaan van de keratineplug die het slotgat van de speen moet afdichten. Ook worden additieven ontwikkeld die een positieve invloed hebben op de uiergezondheid en/of de immuun status/weerstand van de koe, waardoor koeien met een lager celgetal, en daardoor minder risico's op uiergezondheidsproblemen de lactatie afsluiten.

Om de effectiviteit van voer strategieën en / of additieven te kunnen bepalen, is het gewenst om responsparameters te bestuderen die een goede indicatie geven van de gezondheid en de nutriënt behoefte van koe en kalf. Om te bepalen of een voerstrategie daadwerkelijk effect heeft, is het niet altijd voldoende om alleen naar de prestaties van het dier te kijken (voeropname, melkproductie /samenstelling, celgetal en bacteriologisch onderzoek in melk, gewichtsontwikkeling, klinische gezondheidsproblemen etc.), maar is het analyseren van bloed, speeksel, mest, urine en in een aantal gevallen leverbiopten noodzakelijk. Ook kan het van belang zijn om de ontwikkeling van structuren zoals follikels (eicellen) en corpora lutea (geel lichaam) op eierstokken in beeld te krijgen en de status van de baarmoeder (contractie/ ontstekings symptomen) te beoordelen.

Hierbij kan gedacht worden aan onderstaande parameters, welke direct of indirect goede indicatoren kunnen zijn voor de metabole status en gezondheidsstatus van de koe of het kalf.

Door op verschillende tijdstippen tijdens de lactatie van de koe en na de geboorte van het kalf bloed en /of mestmonsters en eventueel leverbiopten te nemen, kan de gezondheidsstatus en de metabole status via deze indicatoren/biomarkers worden gevolgd.

### **Bloed en lever monsters**

De metabole status en de gezondheidsstatus van de koe kunnen door verschillende parameters in het bloed en in de lever worden bepaald. Ter beoordeling van de metabole status en de gezondheidsstatus kan gedacht worden aan indicatoren zoals specifieke nutriënten gehaltes (o.a. Calcium, fosfor en magnesium en ook essentiële aminozuren), metabolieten (o.a. Non Esterified Fatty Acids, Beta-hydroxyboterzuur, Triglyceriden, glucose), hormonen (IGF-1, insuline) maar ook specifieke biomarkers ter indicatie van bijvoorbeeld botmetabolisme (osteocalcine en CTx) of de immuunrespons van de koe (zoals haptoglobine, Serum Amyloid A, immuunglobulinen, leverenzymen, Lipopolysacchariden en de binders hiervan). Over het algemeen zal per experiment een selectie van hieronder beschreven parameters geanalyseerd worden. Voorafgaand aan het experiment wordt daartoe op basis van literatuur of eerder uitgevoerd onderzoek een keuze gemaakt.

Energiebalans:

- NEFA's (niet veresterde vetzuren) geven een beeld van de energiebalans van de koe. Bij onvoldoende energieopname zullen de gehaltes van deze vrije vetzuren in het bloed toenemen. Deze toename wordt veroorzaakt doordat het lichaam de eigen vetvoorraad moet aanspreken. Hoe hoger het NEFA gehalte, hoe meer vet er is afgebroken en hoe hoger vaak het conditieverlies van de koe is. Een verhoging van NEFA's is daardoor een indicatie voor een ontoereikende energie voorziening ten behoeve van foetale groei en / of melkproductie. Een ontoereikende energievoorziening kan een negatief effect hebben op de immuunstatus van de koe en daarnaast op de vitaliteit van het kalf en daarmee op de verdere gezondheidsstatus
- BHBZ:Beta-hydroxyboterzuur is een van de ketonlichamen. Ketonlichamen worden gevormd in de lever vanuit acetyl CoA na omzetting van veresterde vetzuren naar dit product toe. Net als NEFA kunnen deze ketonlichamen gevormd worden indien een negatieve energiebalans aanwezig is.
- Triglyceriden:Triglyceriden kunnen in het bloed circuleren na mobilisatie vanuit lichaamsvet, ofwel bij het voeren van nutriënten met een hoog gehalte aan C2 nutriënten vanuit het voer (van Knegsel et al., 2007). In bloed kunnen de waarden aan triglyceriden bepaald worden. Na opslag van triglyceriden in de lever kunnen ze daar ook leververvetting veroorzaken.

Aminozuren balans:

- De gehalten aan essentiële aminozuren die gemeten kunnen worden in het bloed, geven een beeld van de voorzieningsgraad voor dit type aminozuren via het voer. Bij tekorten aan essentiële aminozuren, kunnen zowel productie als ook immuunstatus van het dier suboptimaal zijn.

#### Immuun-stelsel

- *Acute fase eiwitten*  
Wanneer door uitwendige factoren het inwendige milieu verstoord wordt, gaat dit gepaard met een disbalans van de inwendige homeostase. Dieren zijn uitgerust met een aantal mechanismen om in te spelen op aanvallen van buiten af zoals beschadiging van weefsel en infectie. Metabole en immunologische reacties van de gastheer ten opzichte van aanvallen van buitenaf worden gekenmerkt als een "acute fase respons". Ook een grote verandering zoals het plotseling droogzetten van een koe ofwel het blootstellen van een koe aan een rantsoen dat beperkend is, kan zorgen voor een acute fase respons. Daarnaast kan een dergelijke respons optreden wanneer (subklinische) mastitis optreedt. Bij koeien zijn de meest geanalyseerde acute fase eiwitten de volgende:
  - Haptoglobine (Hp): Haptoglobine wordt voornamelijk in de lever geproduceerd. Bij een intramammaire infectie werd in onderzoek gezien dat het melk Hp verhoogd was na een challenge met lipopolysacchariden (LPS) welke vrijkomen bij infecties met gramnegatieve bacteriën. Ook bij baarmoederontstekingen is in meerdere onderzoeken een verhoogd Hp gevonden in bloed. In onderzoek van Ametaj et al.(2011) waarin leververvetting werd opgewekt, werd na afkalven bij dieren met vette levers een verhoogd Hp gevonden.
  - Lipopolysaccharide Bindend eiwit (LPB): als maat voor lipopolysacchariden die bij specifieke aandoeningen zoals pens- en dikke darmverzuuring en infecties met specifieke bacteriën vrij kunnen komen.
  - Serum Amyloid A behoort tot de familie van de apolipoproteïnen. SAA wordt geproduceerd in de uier als die geïnfecteerd is. Het voeren van rantsoenen met veel granen worden geassocieerd met verhoogde concentraties aan SAA in bloed. Waarschijnlijk is dit het gevolg van translocatie van endotoxines naar de systemische circulatie toe welke dan het vrijkomen van cytokines stimuleert. Ametaj (2011) heeft aangetoond dat bij dieren die veel granen gevoerd kregen en daardoor leververvetting ontwikkelden een hoger gehalte aan SAA in het bloed werd gevonden. Ook is een verhoogd SAA gevonden bij dieren met een verplaatste lebmaag, baarmoederontsteking en leververvetting. Daarnaast is een verhoogd SAA gevonden bij Downerkoeien (dieren welke blijven liggen na het afkalven en waarbij mogelijk een hypo fosfataemie een van de oorzaken is).
- Immunglobulines: De humorale immuunrespons wordt gekenmerkt door de productie van antilichamen. Dit zijn immunglobulines (Ig). Immunglobulines welke door de volwassen koe geproduceerd worden, worden in biest uitgescheiden. Om voldoende weerstand (maternale immuniteit) op te doen na de geboorte dient het kalf biest en daarmee IgG op te nemen vanuit deze biest. Onderzoek van bloed van jonge kalveren voor bepaling van Immunglobulines geeft een indicatie van de immuunstatus van het kalf kort na de geboorte.
- Mineralgehaltenes en afbraakparameters botweefsel: Serum CTx en serum osteocalcine zijn als biomarkers voor botresorptie en Ca en P-mobilisatie rondom het afkalven en herstel van botopbouw later in lactatie van belang. Botopbouw en -afbraak zijn afhankelijk van de activiteit van osteoblasten en osteoclasten. Deze parameters samen met bloed-gehaltenes aan calcium, fosfor en magnesium worden vooral rondom afkalven gemeten als responsparameters op verschillende rantsoentypen in droogstand en vroege lactatie
- Daarnaast zijn bepaalde hormonen (inclusief tussenproducten) en enzymen relevant voor het metabolisme van de koe. Insuline en groeihormonen (zoals bijvoorbeeld IGF-1 en 2) spelen bijvoorbeeld een belangrijke rol in de regulatie van energie en eiwitmetabolisme tijdens dracht en lactatie. Leverenzymen kunnen informatie geven over het functioneren van de lever, en cortisol kan een indicator zijn voor (metabole) stress.

- In leverweefsel kunnen verder verschillende sporenelementen (zoals zink, koper, molybdeen) bepaald worden welke van belang zijn voor immuunfuncties van het rund. De koe zal altijd trachten om bloedspiegels voor mineralen en sporenelementen zolang mogelijk stabiel te houden. Wanneer onderzoek wordt uitgevoerd waarbij juist sporenelementen-analyses van belang zijn kan het nuttig zijn om deze voorraad van deze elementen in de lever te meten.

### **Mestmonsters**

Zowel bij volwassen koeien als ook bij kalveren kunnen mestmonsters benut worden voor bepaling van de samenstelling van de microflora (Dowd et al. 2008). De microflora van de mest is representatief voor de microflora van de darm. Het analyseren van type en aantal bacteriën in de mest wordt nog niet veelvuldig benut, maar lijkt een indicatie te kunnen geven van de (darm) gezondheid van de koe en het kalf en de mate van uitscheiding van (pathogene) bacteriën, welke van invloed zijn op gezondheid van het dier. Bij het kalf kunnen ook micro-organismen welke aanleiding kunnen geven tot het ontstaan van diarree bepaald worden.

Daarnaast kan in mest de uitscheiding van macromineralen bepaald worden, zodat deze kan worden meegenomen in de mineralenstatus en het effect van droogstand rantsoenen.

### **Urinemonsters**

Urinemonsters kunnen worden benut voor analyse op mineralen zoals fosfor en magnesium. Bij het vrijkomen van parathormoon, bijvoorbeeld, dat bij het ontstaan van melkziekte verhoogd aanwezig is, komt fosfor in de urine terecht. Daarnaast is de status van de melkkoe voor Magnesium het beste te bepalen in de urine. Ook een meting van de urine-pH kan informatie geven over droogstand rantsoenen. Van de urine pH kan de metabole pH worden afgeleid, welke van belang is voor de problematiek m.b.t. melkziekte.

### **Speekselmonsters**

Speekselmonsters kunnen worden benut voor analyse op mineralen zoals bijvoorbeeld fosfor. Fosfor wordt gerecirculeerd binnen de koe via het speeksel, waardoor het dier efficiënt met fosfor om kan gaan (Valk et al. 2002). Daarnaast kan het stresshormoon Cortisol in speeksel worden gemeten (Negrao et al. 2004).

### **Echoscopie van baarmoeder en eierstokken**

Met behulp van (rectale) echoscopie kan in de periode na afkalven de ontwikkeling van baarmoeder en eierstokken gevolgd worden. Hierbij kunnen afwijkingen zoals ontstekingen van de baarmoeder, activiteit van ovaria (eierstokken), aantallen en maat van follikels (eicellen) en corpora lutea (gele lichamen) in beeld worden gebracht. Ook kunnen afwijkingen op de ovaria zoals cystes en verminderde activiteit geregistreerd worden.

Bovengenoemde parameters zijn het meest gebruikelijk, echter afhankelijk van de te beantwoorden vraag kan het voorkomen dat er andere parameters in bloed, lever, urine of mest moeten worden geanalyseerd.

Samenvattend kan het volgende worden gesteld:

Het is bekend dat bepaalde voer strategieën en / of het gebruik van additieven de gezondheid, vruchtbaarheid, het welzijn, en de technische resultaten van de koe kunnen verbeteren. Een goede gezondheid tijdens cruciale periodes van de lactatie van de koe zal resulteren in een goede (uier)gezondheid bij droogzetten, en na afkalven (opstart in de nieuwe lactatie) en daardoor een lagere

behoefte aan gebruik van medicijnen. Daar naast resulteert het in een goede vitaliteit van het nieuwgeboren kalf. Hierdoor kan volstaan worden met een lager antibioticumgebruik bij koe en kalf.

Referenties:

- Ametaj B.N., Afshin Hosseini, John F. Odhiambo, Summera Iqbal, Sumeet Sharma, Qilan Deng, Tran H. Lam, Umar Farooq, Qendrim Zebeli and Suzanna M. Dunn, 2011 Application of Acute Phase Proteins for Monitoring Inflammatory States in Cattle. Book: Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases. DOI: 10.5772/1045
- Bach A., Ruminant Nutrition Symposium: Optimizing Performance of the offspring: Nourishing and managing the dam and postnatal calf for optimal lactation, reproduction, and immunity. *J. Anim. Sci.* 2012.90:1835–1845
- Bradford B.J., K. Yuan, J. K. Farney, L. K. Mamedova, and A. J. Carpenter 2015. Invited review: Inflammation during the transition to lactation: New adventures with an old flame. *J. Dairy Sci.* 98:6631–6650
- Dowd S.E, Callaway T.R, Wolcott R.D, Sun Y, McKeenan T, Hagevoort R.G, Edrington T.S. 2008. Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP). *BMC Microbiol.* 2008 Jul 24;8:125.
- Drackley J.K. and H.D. Dann 2005. New Concepts in Nutritional Management of Dry Cows Advances in Dairy Technology (2005) Volume 17
- Goff Jesse P., 2000. Pathophysiology of Calcium and Phosphorus Disorders. The Veterinary clinics of North America. Food Animal practice.
- Grummer R., R. Ordway 2011. Energy and Protein Nutrition for Transition Cows. Penn State Dairy Cattle Nutrition Workshop
- Grunberg W., S.S. Donkin, and D. Constable 2011. Periparturient effects of feeding a low dietary cation-anion difference diet on acid-base, calcium and phosphorus homeostasis and on intravenous glucose tolerance test in high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94: 727-745
- Horst R.L., J.P. Goff and T.A. Reinhardt 1994. Calcium and Vitamin D metabolism in the Dairy Cow. *J. Dairy Sci.* 77: 1936-1951
- Kaske M., S Wiedemann, H. Kunz, 2010: Metabolic programming: background and potential impact for dairy cattle. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 2010,79.
- Knegsel A.T.M. van., H. van den Brand, E.a.M. Graat, J. Dijkstra, R. Jorritsma, E. Decuypere, S. Tamminga and B. Kemp, 2007. Dietary Energy Source in Dairy Cows in early lactation: Metabolites and Metabolic Hormones) *J. Dairy Sci.* 90:1477-1485
- Lean I.J., P.J. DeGaris, D.M. McNeil and E. Block 2006. Hypocalcemia in Dairy Cows: Meta-analysis and Dietary Cation Anion Difference Revisited. *J. Dairy Sci.* 89:669-684
- Negrão J.A., M.A. Porcionato, A.M. de Passillé, J. Rushen 2004. Cortisol in Saliva and Plasma of Cattle After ACTH Administration and Milking *J. Dairy Sci.* 87,6: 1713–1718
- Odensten, M.O., K. Holtenius and K. Persson Waller. 2007. Effects of two different Feeding strategies during dry-off on certain health aspects of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90: 898-907.
- Peterson A.B., M.W. Orth, J.P. Goff, and D.K. Beede, 2005. Periparturient Responses of Multiparous Holstein Cows Fed Different Dietary Phosphorus Concentrations Prepartum. *J. Dairy Sci.* 88:3582-3594.
- Tesfa A.T., M. Tuoria, L. Syrjä-Ela-E-Qvista, R. Poëso-Èb, H. Saloniemi K. Heinonen, K. Kivilahtic, T. Saukkob, L.-A. Lindberg 1998. The influence of dry period feeding on liver fat and postpartum performance of dairy cows. *Animal feed sci. and techn* 76 (1999) 275±295.
- Tucker, C.B., S.J. Lacy-Hilbert and J. R. Webster. 2009. Effect of milking frequency, and feeding level before and after dry off on dairy cattle behavior and udder characteristics. *J. Dairy Sci.* 92:3194-3203.
- Valk H., L.B.J. Šebek, A.C. Beynen 2002. **Influence of Phosphorus Intake on Excretion and Blood Plasma and Saliva Concentrations of Phosphorus in Dairy Cows.** *J.Dairy Sci.*, 85: 2642–2649

### 3.2 Doel

Beschrijf de algemene doelstelling en haalbaarheid van het project.

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

Doel van het onderzoek

Het doel van het project is het testen van voer strategieën en additieven om de gezondheid van melkkoeien tijdens kritische periodes van de lactatie te ondersteunen. De resultaten van het onderzoek zullen worden gebruikt voor advisering van nationale en internationale mengvoerbedrijven en / of toeleveranciers van de testproducten.

Haalbaarheid

De kans dat bovengenoemde onderzoeksvraag binnen de looptijd van het project wordt beantwoord is zeer groot. Het instituut waar de proeven worden uitgevoerd is een onafhankelijk privaat kennis- en informatiecentrum voor diervoeding en heeft de beschikking over eigen onderzoeksfaciliteiten en expertise om bovenstaande onderzoeksvraag te beantwoorden. Beschikbare expertises zijn kennis van verteringsfysiologie, darmgezondheid, microbiologie, grondstoffenkennis, ervaring met voederwaardering en kennis van nutritionele behoeften van dieren. Het bedrijf doet veel contractonderzoek met leveranciers voor de ontwikkeling van voeradditieven om gezondheid te verbeteren, waardoor het bedrijf veel ervaring heeft opgebouwd met het uitvoeren van dit type onderzoeksprojecten.

### 3.3 Belang

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

Algemeen: Het verminderen van het antibioticumgebruik in de rundveehouderij door het ondersteunen van de gezondheid van koeien door middel van voer. Het verbeteren van de gezondheidsstatus van volwassen koeien zal bijdragen aan het verbeteren van het welzijn van de dieren en daarmee ook de economische resultaten. Ook zullen dieren ouder worden waardoor de duurzaamheid van de melkkoe kan verbeteren. Daarnaast zal verbetering van de gezondheid van de volwassen dieren een invloed hebben op de gezondheid van de nakomelingen. Naast een vermindering van het antibioticumgebruik bij melkkoeien is het van belang om ook het antibioticumgebruik bij de nakomelingen (fok en vleeskalveren) te verminderen.

Op dierniveau: Verkrijgen van inzicht over de wijze waarop voer strategieën en additieven invloed uitoefenen op metabole status en immuun status van rundvee.

Inzicht krijgen in de wijze waarop strategieën kunnen worden ingezet om de koe te ondersteunen in de periodes van de lactatie waarin de risico's op gezondheidsproblemen het grootst zijn. Dit zijn vooral de periode rondom het droogzetten van koeien en de periode rondom het afkalven waarbij geldt dat problemen vaak gedurende een lange periode tijdens de lactatie van invloed zijn op het functioneren van de koe. Daarbij is ook het inzicht in de invloed van de gezondheidsparameters van de koe op de nakomelingen van belang.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het instituut voert zowel collectief onderzoek op projectbasis als ook contract research uit.

Het collectief onderzoek wordt uitgevoerd voor mengvoerbedrijven en in dit type onderzoek worden nieuwe concepten en strategieën ontwikkeld en getest.



In de meeste gevallen zal dit gaan om strategieën rondom de periode waarin een koe wordt drooggezet, droogstandsperiode en opstart van de lactatie.

Het contract research bestaat voornamelijk uit onderzoek naar additieven. Dit betreft producten die ontwikkeld worden door toeleveranciers van de mengvoerindustrie. Deze producten zijn doorgaans in de ontwikkelfase, maar er kunnen ook vergelijkende studies worden uitgevoerd waarin meerdere additieven worden getest. In de meeste gevallen zijn de producten geregistreerd in de EU en is het doel van het onderzoek om voldoende resultaten te verkrijgen om de producten uit te zetten op de markt. In een klein deel van de onderzoeken zal het gaan om registratiestudies voor de EFSA (European Food Safety Authority). Deze additieven zullen in alle gevallen wel uitgebreid in vitro getest zijn en op kleine schaal bij het doeldier, maar moeten nog op grotere schaal getest worden voordat ze op de Europese markt kunnen worden uitgezet.

Het contractresearch bestaat voor het grootste deel uit losstaande proeven. De proeven zullen worden uitgevoerd in die periode van de lactatie van de koeien welke op basis van het type additief als meest geschikt wordt geacht. Hiertoe wordt voorbereidend literatuuronderzoek gedaan. Samen met de R&D afdeling van de opdrachtgever wordt door de onderzoekers een proefopzet vastgesteld.

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

Een productieproef met melkkoeien wordt uitgevoerd met 2 tot 6 behandelingen. Het moment van aanvang en de duur van de proef zijn afhankelijk van het werkingsmechanisme van de voerstrategie of het additief dat getest wordt. Standaard productieparameters van de koe zoals voeropname, melkproductie en melksamenstelling, ontwikkeling body-conditiescore en gewicht en gezondheids- en vruchtbaarheidsparameters worden geregistreerd. Afhankelijk van het doel van de proef kan het noodzakelijk zijn om bij (een selectie van) de koeien (en in enkele gevallen hun kalveren) bloed, speeksel, urine en mestmonsters te nemen om parameters ter indicatie van de metabole status en/of de gezondheidsstatus van de koe (en haar kalf) te bestuderen. In een enkel geval zullen bij volwassen koeien ook leverbiopten worden genomen of zullen de geslachtsorganen met behulp van echoscopie worden onderzocht.

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.

In contractonderzoek zullen steeds individuele vraagstellingen worden onderzocht.

In het collectieve onderzoek kunnen onderzoeken met het zelfde thema elkaar opvolgen, waarbij de vraagstelling van onderzoek voortkomt vanuit de uitkomsten van een eerder uitgevoerde proef.

Voorafgaand aan iedere proef (zowel bij voedings-concepten als ook bij additieven) zal de literatuur worden geraadpleegd waarbij de volgende onderwerpen aan bod komen, om tot de beste proefopzet te komen voor het te testen additief of de te testen voerstrategie:

Achtergrond additief of voerstrategie

Wijze van opnemen in het voer van het testproduct en de te gebruiken dosering

Welke periode van de lactatie is van belang om een goede beoordeling te maken van de onderzoeksvraag

Welke responsparameters zijn naast technische resultaten nodig om de onderzoeksvraag te beantwoorden (mest, urine, speeksel, bloed, lever, echoscopie voortplantingssysteem)?

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

| Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 1          | Voeder en Productieproef lacterende en droogstaande melkkoeien |
| 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          | Voeder en productieproef lacterende en droogstaande melkkoeien |
- 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.

Een optimale nutriënten voorziening en een goede gezondheid van de melkkoe tijdens de periode waarin een koe moet worden drooggezet, in de droogstands periode zelf, en tijdens de start van de lactatie is de basis voor een productieve, gezonde lactatie met een goede vruchtbaarheid waarbij een vitaal kalf geboren wordt en na afkalven een kwalitatief hoogwaardige biest wordt geproduceerd.

Het doel van de proef is het ontwikkelen van voer strategieën en het testen van additieven die de gezondheid van de koeien tijdens de meest kritische periodes van de lactatie zo optimaal mogelijk ondersteunen.

#### Experimentele aanpak

- Transitieproeven starten in principe 5-3 weken voor de verwachte afkalfdatum en lopen door tot 6-18 weken in de lactatie.
- Proeven in welke de invloed van voer strategieën en additieven op (uier)gezondheid rondom het droogzetten wordt getest starten in principe 12-6 weken voor de datum van droogzetten en lopen door tot 2-10 weken in de volgende lactatie

De koeien worden ingedeeld in 2 tot 6 voerbehandelingen. Dit kunnen verschillende strategieën zijn op het gebied van nutriënten niveaus. Ook kan het gaan om additieven die de gezondheid rondom het droogzetten van koeien ofwel het afkalven bevorderen. De exacte duur van de proef is afhankelijk van de vraagstelling en de verwachte periode voor het droogzetten ofwel na afkalven gedurende welke de voerstrategie of het additief van invloed is op de productie ofwel gezondheid/ vruchtbaarheid kenmerken.

De technische resultaten binnen deze periode worden altijd vastgelegd (voeropname, lichaamsgewicht en conditiescoreverloop en, wanneer het dier in productie is, de melkproductie en melksamenstelling). Daarnaast wordt, indien onderdeel van het onderzoeksplan, de performance van de geboren kalveren bijgehouden.

Naast de technische resultaten worden in deze experimenten de dieren bemonsterd, om subklinische / metabole verschillen tussen proefgroepen te kunnen analyseren. Het kan hier gaan om bloedmonsters, mestmonsters, urinemonsters, speekselmonsters en leverbiopten. Ook kunnen vruchtbaarheidskenmerken gevolgd worden door middel van rectale echoscopie.

### **Uitkomstparameters**

Technische resultaten: deze metingen zijn routinematig en niet invasief:

- Voeropname (dagelijks)
- Melkproductie (vanaf afkalfmoment (dagelijks)
- Melksamenstelling (4-6 x per week)
- Lichaamsgewicht (2 x daags)
- Conditiescore (meerdere malen tijdens de proef)
- Kalf: geboortegewicht, groei, voeropname

De technische resultaten van de dieren geven een eerste indruk van het effect van de voerbehandeling.

Technische resultaten in combinatie met de resultaten van onderstaande parameters geven een compleet beeld van het effect van het testproduct of de voerstrategie op de metabole status en/ of de gezondheid van de koe.

#### Bloedmonsters:

De metabole status en de gezondheidsstatus van de koe kunnen door verschillende parameters in het bloed worden bepaald. Ter beoordeling van de metabole status en (indirect) de gezondheidsstatus van de koe kan gedacht worden aan indicatoren zoals specifieke nutriënten gehalten (o.a. calcium, fosfor en magnesium en ook essentiële aminozuren), metabolieten ((o.a. Non Esterified Fatty Acids (NEFA's),  $\beta$ -hydroxy-boterzuur (BHBZ), triglyceriden en glucose)), maar ook aan specifieke biomarkers ter indicatie van bijvoorbeeld botmetabolisme (o.a. vitamine D3, Osteocalcine) of de immuunrespons (haptoglobine, serum amyloid A, Lipopolysaccharide Bindend eiwit, immuunglobulines) van de koe. Daarnaast zijn bepaalde hormonen en enzymen (zoals o.a. insuline, IGF-1, leverenzymen) relevant voor metabolisme en leverfunctie van de koe.

#### Leverbiopten:

Om een goede indicatie te krijgen van de voorziening van sporenelementen of van een leververvetting kunnen leverbiopten worden genomen. Bij onderzoeken waar het van belang is om meer te weten over gehalten aan koper, zink, cobalt, ijzer en molybdeen en ook bij onderzoeken waarbij er een kans is dat een ophoping van triacylglyceriden in de lever plaatsvindt kan deze methode gebruikt worden. Echter in minimaal 85% van de proeven zal volstaan kunnen worden met bloedonderzoek.

#### Mestmonsters:

De microflora in de mest is representatief voor de microflora in de darm. Het analyseren van type en aantal bacteriën in de mest van de koe en eventueel ook haar kalf, geeft een goede indicatie van de (darm)gezondheid van de dieren. Bij kalveren kunnen ook specifieke ziekteverwekkers / verwekkers van diarree zoals specifieke bacteriën, virussen, en parasieten geanalyseerd worden in de mest. Daarnaast worden bepaalde mineralen in mest uitgescheiden. Dit geldt voor onder andere Magnesium en Fosfor.

#### Urinemonsters:

Urine is de meest indicatieve lichaamsvloeistof voor bepaling van de voorziening van de koe aan Magnesium. Magnesium is een van de macromineralen welke rondom het afkalven verlaagd kan zijn. Daarnaast kan in urine de pH gemeten worden (voor het verkrijgen van een goede indicatie voor de kation-anion balans in de melkkoe rondom het afkalven).

### Speekselmonsters:

In speeksel kan bijvoorbeeld onderzoek worden gedaan naar fosfor gehalten. Fosfor wordt door herkauwers gerecirculeerd via het speeksel waardoor efficiënt gebruik van fosfor door herkauwers mogelijk is. Ook gehalten aan cortisol, een indicator voor stress, kan geanalyseerd worden in speeksel.

### Echoscopie:

Door middel van echoscopie via het rectum van de koe kunnen waarnemingen worden gedaan m.b.t. de baarmoeder en de ovaria. Hierbij kunnen activiteit van de ovaria, aantallen follikels (eicellen) en corpora lutea (gele lichamen) maar ook afwijkende structuren in beeld worden gebracht.

In iedere proef wordt een afweging gemaakt welke responsparameters de onderzoeksvraag het beste kunnen beantwoorden en of hier bloed, urine, speeksel of mestmonsters dienen te worden genomen, of dat het ook nodig is om leverbiopten te nemen en echoscopie uit te voeren.

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.

Voerbehandelingen kunnen behandelingen zijn welke verschillen op het gebied van:

- Energiegehalte en energie type (glucogene energie ofwel energie vanuit diverse types vet)
- Eiwitgehalte
- Vezelgehalte / structuurwaarde
- Amino-zuren gehalten
- gehalten aan macromineralen, waarbij gedacht kan worden aan calcium, magnesium, kalium en fosfor
- Vitamines en sporenelementen

Naast basale voerbehandelingen kunnen ook diverse additieven worden toegepast, waarbij gedacht kan worden aan:

- Gisten
- Enzymen
- Etherische oliën
- Additieven met werkingsmechanismen welke metabole systemen kunnen beïnvloeden.

Bij onderzoek waarin droogstand strategieën worden getest is over het algemeen de metabole status van de koe rondom het afkalven van belang. Daarom ligt het zwaartepunt van het bemonsteren voor bloed in principe rondom het moment van afkalven. Vanaf 3 tot 5 weken voor de verwachte afkalfdatum tot aan ongeveer 10 weken in lactatie zullen per koe maximaal 8 bloedmonsters worden afgenomen vanuit de staartvene.

Indien kalveren binnen dit type onderzoek bemonsterd worden zal het gaan om een maximum van 5 x een bloedmonster en/of mestmonster per kalf, evenredig verspreid over de eerste 10 levensweken.

In enkele onderzoeken zullen leverbiopten worden genomen. Dit zal maximaal 4 x per koe worden gedaan.

Niet alle koeien binnen een behandeling zullen worden ingezet voor leverbiopsie. Dit zullen maximaal 15 dieren per (voer) behandeling zijn. Leverbiopten worden genomen bij het staande (aangebonden) dier na lokale verdoving en een lichte sedatie. De dieren worden hiervoor op een schone stand geplaatst en gewassen en geschoren voorafgaande aan de biopsie volgens de protocollen welke ontwikkeld zijn door [REDACTED]. Maximaal 5 keer per koe per proef zal een urine- en of mestmonster worden genomen. Ook bemonstering van speeksel zal maximaal 5 x per koe per proef worden uitgevoerd. De mest en urinemonsters zullen in principe genomen worden bij spontane defaecatie/ urinelozing.

De bemonsteringen zullen gelijkmatig verspreid over deze periode worden uitgevoerd.

Indien vruchtbaarheidskenmerken van belang zijn kan gebruik gemaakt worden van (rectale) echoscopie van baarmoeder en eierstokken. Dit zal plaatsvinden in de periode tot 18 weken na afkalven en per dier zal dit type onderzoek maximaal 10 x uitgevoerd worden (verspreid over de periode).

Bij onderzoek waarin strategieën rondom het droogzetten van koeien worden getest, is over het algemeen de metabole status en de immuun status van de koe vanaf droogzetten tot en met het afkalven van belang. Vanaf 3 weken voor de droogzetdatum tot aan ongeveer 4 weken in lactatie (totale periode van ongeveer 13 weken) zullen per koe maximaal 8 bloedmonsters worden afgenomen uit de staartvene. In enkele

onderzoeken zullen leverbiopten worden genomen. Dit zal maximaal 4 x per koe worden gedaan bij maximaal 15 dieren per voerbehandeling. Maximaal 5 keer per koe per proef zal een urine- en of mestmonster worden genomen. De mest en urinemonsters zullen in principe genomen worden bij spontane defaecatie/ urinelozing. Indien speekselmonsters worden genomen, zal dit maximaal 5 x per dier per proef plaatsvinden.

De bemonsteringen zullen gelijkmatig verspreid over deze periode worden uitgevoerd.

In zijn algemeenheid geldt dat een keuze zal worden gemaakt uit de verschillende types bemonsteringen. Deze keuze is afhankelijk van het type additief / strategie en de exacte periode van onderzoek.

De duur voor het afnemen van een bloedmonster zal ongeveer 5 minuten zijn

De duur van het afnemen van een mestmonster / urinemonster zal 5 minuten zijn

De duur van het afnemen van een speekselmonster zal (inclusief fixeren van de koe) 10 minuten zijn

De duur van het nemen van een leverbiopt zal (inclusief voorbereidingen zoals verdoven en scheren/wassen) 20 minuten zijn.

De duur van rectale echoscopie zal ongeveer 2 minuten per onderzoek zijn.

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

Het totaal aantal dieren in de proef is gebaseerd op de kleinst mogelijke verschillen tussen proefgroepen die statistisch aangetoond kunnen worden, het kleinste relevante verschil (KSV) die in de voorgaande jaren in dezelfde faciliteiten zijn gevonden. Voor de aanvullende waarden worden literatuurgegevens en gegevens uit eerdere proeven gebruikt om het aantal benodigde dieren te berekenen in een poweranalyse.

## **B. De dieren**

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

Diersoort: melkkoeien: einde lactatie, droogstaand en eerste helft lactatie en in een deel van de gevallen hun kalveren

Herkomst: melkveestapel proefbedrijf

Aantal dieren: Dit type proef zal maximaal 3 x per jaar worden uitgevoerd met 2-6 behandelingen. Voor de bloed, speeksel, mest en urine monsters worden 12-25 dieren per behandeling gebruikt. Het totaal aantal dieren waarbij ongerief wordt verwacht is dus 24-150 per proef. Voor de leverbiopten zullen maximaal 15 dieren per behandeling worden gebruikt. In maximaal 2 van de onderzoeken gedurende de periode van 5 jaar zullen leverbiopten worden genomen. Dit betekent dat bij maximaal 8% van de koeien binnen dit project leverbiopten zullen worden genomen (2 proeven met 30-90 dieren per proef).

Bij de meeste onderzoeken kan worden volstaan met een proefgroep van 12 – 16 dieren. In een enkel geval dienen hogere aantallen dieren bemonsterd te worden om verschillen te kunnen aantonen.

Het verschil in het aantal dieren heeft te maken met de verwachte variatie in responsparameters. Indien mogelijk zal het dier als zijn eigen controle worden gebruikt, waardoor het aantal dieren kan worden geminimaliseerd.

De kalveren van de koeien uit de proeven worden alleen als proefdier gemeld als zij daadwerkelijk zelf bemonsterd worden. Het is niet te verwachten dat de kalveren zolang zij niet geboren zijn ongerief zullen hebben van de behandeling die bij de moeder wordt toegepast. De verwachting is dat maximaal 1 proef per jaar met 2 tot 6 behandelingen zal worden gebruikt om kalveren te bemonsteren. Per behandeling zullen 12 -20 dieren bemonsterd worden. Maximaal zullen dit dus 120 kalveren per jaar zijn.

## **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.

Het is mogelijk dat een koe eerder in een andere proef is ingezet, of dat een koe en / of kalf na afloop in een andere proef wordt ingedeeld. Daarbij wordt gekeken naar de ernst van het ongerief en naar de

gezondheid van de koe en / of het kalf. Indien dieren worden hergebruikt hebben deze dieren in een vorige proef alleen maar licht ongerief ondergaan.

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

Nee

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

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

##### Vervanging

De additieven die onderzocht zullen worden, zijn in een eerder stadium in vitro onderzocht. Deze producten zijn in de laatste fase van het ontwikkelingstraject en worden daarom in het doeldier getest.

Voor het bepalen van het effect van verschillende voer strategieën op productieresultaten is een in vivo proef nodig. De beschikbare in vitro modellen geven geen inzicht in het effect van voeders op de reactie van dieren onder verschillende omstandigheden die de gezondheid kunnen beïnvloeden en in de effecten op productieresultaten. Daarom is het onderzoeken van voer strategieën in het doeldier de enige methode om te kunnen komen tot praktisch inzetbare voer strategieën.

##### Vermindering:

De monsters worden bij een minimaal aantal dieren per behandeling verzameld. Met behulp van een power test wordt bepaald welk aantal dieren nodig is voor het beantwoorden van de vraagstelling

De variatie in bijvoorbeeld bloedwaarden of melksamenstelling tussen koeien kan groot zijn. Aangezien er meerdere monsters van dezelfde soort (bloed, lever, mest, urine, speeksel) in verloop van de tijd bij een koe worden afgenomen kan de individuele koe als eigen controle dienen in de bepaling van de te analyseren parameters. De waarde van de eerste meting zal dan als uitgangspunt worden genomen. Hierdoor zijn minder dieren nodig om een uitspraak te doen over het effect van een behandeling.

##### Verfijning:

Mest en urinemonsters worden in principe verzameld bij spontane defaecatie/ urinelozing.

Het nemen van bloedmonsters wordt uitgevoerd door personeel dat veel ervaring heeft met rundvee en daardoor op een rustige bekwame manier de bemonstering verzorgt. Bloedmonsters worden afgenomen vanuit de staartvene, wat voor koeien slechts een minimale hoeveelheid stress oplevert. Het nemen van leverbiopten wordt zoveel mogelijk geminimaliseerd. Slechts in maximaal 2 van de onderzoeken gedurende de periode van 5 jaar zullen leverbiopten worden genomen. Daarnaast wordt bij maximaal 15 dieren per (voer)behandeling een leverbiopt genomen. Indien dit wel nodig is, wordt de handeling uitgevoerd door goed geschoolde en goed getrainde personen volgens een protocol ontwikkeld door ██████████

██████████. Dieren worden hiervoor lokaal verdoofd en krijgen een lichte sedatie, en worden uitgebreid gemonitord. Koeien van welke een leverbiopt wordt genomen worden extra gemonitord (2 x daags temperaturen en 2 x daags controle voeropname in de 3 dagen na bemonstering) en indien dieren minder goed reageren wordt overlegd met een dierenarts over eventuele behandeling/ maatregelen. Het uitvoeren van rectale echoscopie wordt uitgevoerd door een specifiek op dit gebied getrainde echograaf.

Dieren worden gehuisvest in hun vertrouwde leefomgeving, in de ligboxenstal met diepstrooiselboxen op het melkveebedrijf van het onderzoeksinstituut. Voor het onderzoek worden de dieren in de praktijkomgeving gehouden om te voorkomen dat zij uit hun vertrouwde omgeving en uit hun koppel gehaald moeten worden.

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

De gezondheid van koeien en kalveren wordt dagelijks bekeken en bijzonderheden worden in een welzijnsdagboek geregistreerd en gemeld aan verantwoordelijk onderzoeker of zijn/haar vervanger.

## **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.

Voor onderzoek van ieder testproduct wordt de literatuur geraadpleegd voor de start van het experiment om duplicatie te voorkomen. Het doel van dit project is om met de kennis vanuit de literatuur te komen tot voerstrategieën die in de praktijk goed toe te passen zijn. Soms worden voermaatregelen die beschreven worden in de literatuur gecombineerd.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

- De dieren zijn gehuisvest op hun plaats van herkomst, het melkveebedrijf, en worden hier verzorgd volgens de gebruikelijke protocollen voor huisvesting en verzorging van melkvee. Dit voldoet qua minimale omvang leefruimte en trogruimte aan de eisen in bijlage III. De boxen zijn voorzien van diepstrooisel en voor alle dieren is er tegelijkertijd plaats om te liggen of te eten. Alleen op het punt van oppervlakte per dier voldoet de huisvesting niet aan bijlage III. Het onderzoek binnen dit projectvoorsel is praktijkgerelateerd onderzoek, daarom worden de dieren in hun praktijkomgeving gehuisvest. Volgens de richtlijn dient per volwassen koe (>600 kg) een minimale bodemoppervlak per dier van 8,75 m<sup>2</sup> beschikbaar te zijn. Op het praktijk/onderzoeksbedrijf is het oppervlak per dier tussen 8 en 8,5 m<sup>2</sup>.

### 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.

Bloedmonsters: de dieren kunnen pijn ervaren tijdens het verzamelen van bloedmonsters door het inbrengen van een naald. Dit is een kortdurende handeling en de pijn is relatief gering. Het toedienen van verdoving zou evenveel ongerief opleveren als het afnemen van bloed. Daarom is besloten om voor deze bemonstering geen verdoving toe te passen.

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

Leverbiopten: Wanneer leverbiopten worden genomen is de werkwijze volgens de methode welke beschreven wordt door de GD Dieren in Deventer. In alle gevallen wordt plaatselijke verdoving toegepast



gecombineerd met een lichte sedatie. De bemonstering wordt bij het staande dier onder steriele omstandigheden uitgevoerd. Indien het dier pijn of onbehagen toont, wordt pijnstilling toegediend.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Nemen van mestmonsters vanuit het rectum  
Rectale echoscopie t.b.v. vruchtbaarheidswaarnemingen  
Nemen van speekselmonsters

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Wanneer mestmonsters niet kunnen worden genomen bij spontane defecatie, worden deze rectaal genomen. Uit het verleden is gebleken dat dit ongeveer in 20-35 % van de gevallen is  
Bij kalveren wordt, indien monsters niet bij spontane defecatie worden genomen, met de vinger rectaal gestimuleerd tot defecatie.

Speekselmonsters worden genomen door een tang met daarin een spons in de bek te plaatsen tussen wangslimvlies en kiezen na fixatie van de koe door een dierversorger. De spons zuigt zich vol speeksel en kan na terughalen uit de bek in een monsterbuis leeggedrukt worden.

Echoscopie: met een kleine scanprobe (ter dikte van een vinger) wordt via het rectum het voortplantingsorgaan onderzocht. Deze methode wordt in de melkveepraktijk veelvuldig toegepast in het kader van de gebruikelijke vruchtbaarheidsbegeleiding door dierenartsen of andere deskundigen. Het enige verschil is dat het in het kader van het onderzoek vaker wordt toegepast. In de praktijk blijken dieren hiervan geen last te hebben.

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

Monsternames en rectale echoscopieën worden uitgevoerd door ervaren, rustig, gekwalificeerd personeel, waardoor er nauwelijks onrust te verwachten is  
De behandelingen worden altijd zo ingezet dat geen klinische symptomen worden veroorzaakt. De (subklinische) symptomen van een minder optimaal rantsoen worden in principe alleen in de monsteranalyses teruggezien.

### 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.

Voor minimaal 92% van de koeien zal het ongerief gering zijn. Voor maximaal 8 % van de koeien (2 proeven over een periode van 5 jaar) kan het ongerief matig zijn. Leverbiopten worden maximaal in 2 proeven (8% van de dieren) gedurende de looptijd uitgevoerd. Het (cumulatieve) ongerief wordt ingeschat als matig wanneer binnen een onderzoek het nemen van leverbiopten in combinatie met andere bemonsteringen en eventueel rectale echoscopie plaatsvindt.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

---

---

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

---

Ja

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: **AVD246002016461**
2. Titel van het project: Het ontwikkelen van voerstrategieën en het testen van additieven die de gezondheid van melkvee te ondersteunen
3. Titel van de NTS: Het ontwikkelen van voerstrategieën en het testen van supplementen die de gezondheid van melkvee ondersteunen
4. Type aanvraag: nieuwe aanvraag projectvergunning
5. Contactgegevens DEC:  
DEC Wageningen-UR  
[REDACTED]  
Secretaris: [REDACTED]
6. Adviestraject  
Ontvangen door DEC: 17-03-2016 (formeel), 23-03-2016 (feitelijk)  
Aanvraag compleet: ja  
In vergadering besproken: 21-03-2016  
Anderszins behandeld: n.v.t.  
Termijnonderbreking(en) van 23-03-2016 tot 29-03-2016  
Aanpassing aanvraag: 29-03-2016  
Advies aan CCD: 08-04-2016
7. Eventueel horen van aanvrager: n.v.t.
8. Correspondentie met de aanvrager n.a.v. vergadering  
Datum vragen: 23-03-2016  
Strekking van de vragen:  
Vragen m.b.t. het projectvoorstel:  
Enkele (redactionele) vragen m.b.t. de achtergrond van de onderzoeksvragen ter verheldering.  
Vragen m.b.t. de appendix:  
Een tekstuele opmerking m.b.t. de beschrijving van het cumulatieve ongerief;  
Een opmerking m.b.t. beschrijving van 'verfijning'.  
Vraag m.b.t. de niet-technische samenvatting:  
Enkele tekstuele opmerkingen.

De antwoorden hebben geleid tot adequate aanpassing van de aanvraag.

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 het oogpunt van productiedoelinden verantwoord is.

2. De DEC heeft vastgesteld dat de in de aanvraag aangekruiste doelcategorieën in overeenstemming zijn met de hoofddoelstelling. Het project richt zich op het ondersteunen van de gezondheid en weerstand van koeien m.b.v. voerstrategieën en -additieven.
3. Het belang van het project wordt door de DEC onderschreven en ingeschat als een reëel belang.
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. Het instituut waar de proeven worden uitgevoerd is een onafhankelijk, privaat kennis- en informatiecentrum voor diervoeding en heeft de beschikking over eigen onderzoeksfaciliteiten en expertise om bovenstaande onderzoeksvraag te beantwoorden. Beschikbare expertises zijn kennis van verteringsfysiologie, darmgezondheid, microbiologie, grondstoffenkennis, ervaring met voederwaardering en kennis van nutritionele behoeften van dieren. Het bedrijf doet veel contractonderzoek met leveranciers voor de ontwikkeling van voeradditieven om gezondheid te verbeteren, waardoor het bedrijf veel ervaring heeft opgebouwd met het uitvoeren van dit type onderzoeksprojecten.
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren: Op het punt van oppervlakte per dier voldoet de huisvesting niet aan bijlage III van de Richtlijn. De dieren worden in hun praktijkomgeving gehuisvest, aangezien het gaat om praktijkgerelateerd onderzoek.
6. De DEC stelt vast dat een cumulatieve inschatting van ongerief realistisch is ingeschat en geclassificeerd. Dit bestaat uit: bloedmonstername, het nemen van leverbiopten (maximaal 8% van de dieren), het nemen van mestmonsters vanuit het rectum, rectale echoscopie t.b.v. vruchtbaarheidswaarnemingen, het nemen van speekselmonsters. Het ongerief is voor minimaal 82% van de dieren gering en voor maximaal 8% kan het oplopen tot 'matig', wanneer binnen een onderzoek leverbiopten in combinatie met andere bemonsteringen en eventueel rectale echoscopie plaatsvindt.
7. De DEC heeft vastgesteld dat er geen alternatieven zijn om de doelstelling van het project te realiseren. De voeders kunnen niet in het laboratorium of in een andere diersoort of ander stadium van de lactatie getest worden. Het lichaam van de koe is te complex om uitkomsten die bij een ander dier of in het laboratorium gevonden zijn te vertalen naar de koe. De voersupplementen die in het project worden getest zijn in een eerdere fase in het laboratorium getest, met een positief resultaat. De laatste stap is om deze supplementen te testen bij de koeien zelf. Omdat het lichaam van de koe een complex systeem is, is het niet precies te voorspellen of de effecten die gevonden zijn in het laboratorium ook daadwerkelijk dezelfde zijn bij het dier. Er is daarom geen vervanging (andere techniek of andere diersoort) mogelijk.
8. De DEC heeft vastgesteld dat er optimaal tegemoet gekomen wordt aan de vereiste van vermindering van dierproeven. Het benodigde aantal dieren wordt met statistische modellen berekend en hierdoor wordt gewerkt met het minimaal benodigde aantal dieren. Wanneer genomen monsters van één dier met elkaar vergeleken kunnen worden en het dier daardoor zijn eigen controle kan vormen zal dit worden gedaan. Op deze manier kan het aantal bemonsteringen verminderd worden.
9. De DEC heeft vastgesteld dat het project in overeenstemming is met de vereiste van verfijning van dierproeven. Mest- en urinemonsters worden in principe genomen bij spontaan mesten en urineren. De koeien worden voor het onderzoek niet verplaatst, maar in hun vertrouwde omgeving en binnen hun vertrouwde koppel gehouden. De DEC is overtuigd dat de dierproeven zo humaan mogelijk worden uitgevoerd.
10. 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. Het verbeteren van de gezondheidsstatus van volwassen koeien zal bijdragen aan het verbeteren van het welzijn van de dieren en daarmee ook de economische resultaten en aan vermindering van het antibioticagebruik bij melkkoeien. Ook zullen dieren door een verhoogde gezondheidsstatus ouder kunnen worden waardoor de duurzaamheid van de melkveehouderij kan verbeteren. Daarnaast zal verbetering van de gezondheid van de volwassen dieren een invloed hebben op de gezondheid van en het antibioticagebruik bij hun nakomelingen (fok en vleeskalveren).

De uitvoering is verder niet in strijd met andere ethische overwegingen m.b.t. het gebruik van proefdieren.

#### **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

Schothorst Feed Research BV

Postbus 533

8200 AM LELYSTAD



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD246002016461

**Bijlagen**

2

Datum 17 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 14 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD246002016461. 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: 24600  
Naam instelling of organisatie: Schothorst Feed Research BV  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 39084732  
Straat en huisnummer: Meerkoetenweg 26  
Postbus: 533  
Postcode en plaats: 8200 AM LELYSTAD  
IBAN: NL24RABO0337738394  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Schothorst Feed Research B.V.

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: [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 mei 2016  
Geplande einddatum: 1 mei 2021  
Titel project: Het ontwikkelen van voerstrategieën en testen van supplementen die de gezondheid van melkvee en hun kalveren ondersteunen  
Titel niet-technische samenvatting: Het ontwikkelen van voerstrategieën en testen van supplementen die de gezondheid van melkvee en hun kalveren ondersteunen  
Naam DEC: DEC Wageningen UR  
Postadres DEC: Droevendaalsesteeg 4 6708 PB Wageningen  
E-mailadres DEC: [REDACTED]

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 935,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:  Projectvoorstel  
 Beschrijving Dierproeven  
 Niet-technische samenvatting

**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

Lelystad

Datum:

14 maart 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Schothorst Feed Research BV

Postbus 533

8200 AM LELYSTAD



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD246002016461

**Bijlagen**

2

Datum 17 maart 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 17 maart 2016

Vervaldatum: 16 april 2016

Factuurnummer: 16700461

| Omschrijving   | Bedrag   |
|--|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD246002016461 | € 935,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Schothorst Feed Research BV  
[Redacted]  
Postbus 533  
8200 AM LELYSTAD  
[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  
AVD246002016461  
**Bijlagen**  
1

Datum 20 mei 2016  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [Redacted]

Op 14 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Het ontwikkelen van voerstrategieën en het testen van additieven die de gezondheid van melkvee te ondersteunen" met aanvraagnummer AVD246002016461. 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. Omdat uit uw aanvraag niet blijkt welke stoffen u zal gaan onderzoeken, maar de uit te voeren handelingen wel omschreven zijn, is een voorwaarde opgenomen dat u de CCD moet terugkoppelen naar welke stoffen onderzoek plaats heeft gevonden. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1a van de wet wordt gesteld om te voldoen aan datgene wat volgt uit dit artikel. U kunt met uw project "Het ontwikkelen van voerstrategieën en het testen van additieven die de gezondheid van melkvee te ondersteunen" starten. De vergunning wordt afgegeven van 20 mei 2016 tot en met 1 mei 2021.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Procedure**

Wij hebben advies gevraagd bij de Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. Dit advies is opgesteld op 8 april 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Er worden aanvullend algemene voorwaarden gesteld.

Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

#### **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

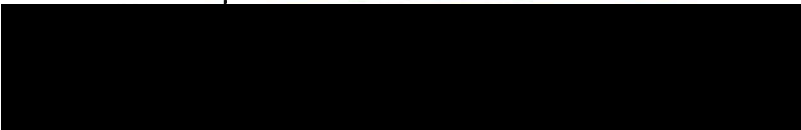
<http://www.rechtspraak.nl/Organisatie/Rechtbanken/Pages/default.aspx> kunt u zien onder welke rechtbank de vestigingsplaats van de aanvrager valt.

#### **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



M. 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: Schothorst Feed Research BV  
Adres: Postbus 533  
Postcode en plaats: 8200 AM LELYSTAD  
Deelnemersnummer: 24600

deze projectvergunning voor het tijdvak 20 mei 2016 tot en met 1 mei 2021, voor het project "Het ontwikkelen van voerstrategieën en het testen van additieven die de gezondheid van melkvee te ondersteunen" met aanvraagnummer AVD246002016461, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Wageningen UR. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED]  
De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 14 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 april 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 8 april 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 8 april 2016, ontvangen op 8 april 2016.

| Naam proef   | Diersoort/ Stam                                       | Aantal dieren | Ernst                             | Opmerkingen |
|--|---|---------------|-----------------------------------|-------------|
| Voeder en productieproef lacterende en droogstaande melkkoeien | Runderen (Bos taurus) / 2250 melkkoeien; 600 kalveren | 2850          | 8,00%<br>Matig<br>92,00%<br>Licht |             |

### Voorwaarden

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

Iedere 3 maanden, ingaande vanaf de startdatum van de vergunning, koppelt de aanvrager aan de CCD terug naar welke welke soort stof en met welke doelstelling deze stoffen getest zijn.

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.





**Van:** info@zbo-ccd.nl  
**Verzonden:** vrijdag 27 mei 2016 15:40  
**Aan:**   
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningaanvraag AVD246002016461

Geachte DEC Wageningen UR,

Op 14-03-2016 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Het ontwikkelen van voerstrategie en het testen van additieven die de gezondheid van melkvee te ondersteunen' met aanvraagnummer AVD246002016461.

De CCD heeft de aanvrager geen aanvullende vragen gesteld.

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

De vergunning wordt verleend onder de volgende voorwaarden:  
 Iedere 3 maanden, ingaande vanaf de startdatum van de vergunning, koppelt de aanvrager aan de CCD terug naar welke welke soort stof en met welke doelstelling deze stoffen getest zijn.

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.

U wordt verzocht in een volgend advies het algemene dilemma m.b.t. de intensieve veehouderij te benoemen.

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

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)

| Inventaris Wob-verzoek W16-16S |                                   |                 |      |        |                   |        |        |        |      |
|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------|------|--------|-------------------|--------|--------|--------|------|
|                                |                                   |                 |      |        |                   |        |        |        |      |
|                                |                                   | wordt verstrekt |      |        | weigeringsgronden |        |        |        |      |
| nr.                            | document                          | reeds openbaar  | niet | geheel | deels             | 10.1.c | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
|                                | <b>NTS2016462</b>                 |                 |      |        |                   |        |        |        |      |
| 1                              | Aanvraagformulier                 |                 |      |        | x                 |        | x      | x      |      |
| 2                              | Projectvoorstel                   |                 |      |        | x                 |        |        | x      |      |
| 3                              | Niet-technische samenvatting      | x               |      |        |                   |        |        |        |      |
| 4                              | Bijlage beschrijving dierproeven  |                 |      |        | x                 |        |        | x      |      |
| 5                              | DEC-advies                        |                 |      |        | x                 |        |        | x      |      |
| 6                              | Ontvangstbevestiging              |                 |      |        | x                 |        | x      | x      |      |
| 7                              | Mail verzoek aanvulling 18-4-2016 |                 |      |        | x                 |        | x      | x      |      |
| 8                              | Reactie verzoek aanvulling        |                 |      |        | x                 |        | x      | x      |      |
| 9                              | Advies CCD                        |                 | x    |        |                   |        |        |        | x    |
| 10                             | Beschikking en vergunning         |                 |      |        | x                 |        | x      | x      |      |
| 11                             | Mail terugkoppeling DEC 10-5-2016 |                 |      |        | 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.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?<br><i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>                          | <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in | 11500  |
|     |   | <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen           |  |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.   | Naam instelling of organisatie                                     | UMC Utrecht  |
|     |   | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde                | [Redacted]   |
|     |   | KvK-nummer   | 30244197   |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | Straat en huisnummer   | [Redacted]   |
|     |   | Postbus  | 12007  |
|     |   | Postcode en plaats   | 3501AA Utrecht   |
|     |   | IBAN   | NL27INGB0000425267   |
|     |   | Tenaamstelling van het rekeningnummer                              | Universiteit Utrecht   |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.  | (Titel) Naam en voorletters  | [Redacted] <input checked="" type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw. |
|     |   | Functie  | [Redacted]   |
|     |   | Afdeling   | [Redacted]   |
|     |   | Telefoonnummer   | [Redacted]   |
|     |   | E-mailadres  | [Redacted]   |
| 1.5 | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.  | (Titel) Naam en voorletters  | [Redacted] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
|     |   | Functie  | [Redacted]   |
|     |   | Afdeling   | [Redacted]   |
|     |   | Telefoonnummer   | [Redacted]   |
|     |   | E-mailadres  | [Redacted]   |

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- Startdatum 1 - 5 - 2016
- Einddatum 31 - 12 - 2020
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De wisselwerking tussen nierziekte en hartziekte
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- Naam DEC DEC Utrecht
- Postadres Postbus 85500 3508 GA Utrecht
- E-mailadres dec-utrecht@umcutrecht.nl

## 4 Betaalgegevens

- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 935,- Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
*Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

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

Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag

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

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

Naam

Functie

Plaats

Datum

Handtekening





## 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.

### 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.

#### **General background and rationale for research on cardiorenal syndrome:**

Heart failure (HF) is a growing worldwide health epidemic and associated with a high mortality and morbidity. It is seen as an abnormality of the function or structure of the heart causing an

inability to sufficiently meet the metabolic requirements of the body. Heart function is defined as the amount or the percentage of blood that is ejected out of the ventricles with each single contraction, also known as the ejection fraction (EF). The EF percentage gives an indication of which type of HF a person has. Two types of HF are distinguished, the first one is heart failure with reduced ejection fraction (HFrEF, EF <45-50%; also termed systolic heart failure) in which the left ventricle no longer contracts with enough force so less blood is ejected out of the ventricles with each contraction. A main feature of HFrEF is eccentric remodelling (i.e. dilation of the left ventricle) that is commonly seen after a myocardial infarction in which direct injury of the cardiomyocytes takes place and formation of fibrotic tissue subsequently follows. The second type is heart failure characterized by a preserved ejection fraction (HFpEF, EF >45-50%; also termed as diastolic heart failure) and abnormal diastolic function, usually with concentric remodelling or hypertrophy.

A clinical marker used for diastolic function (relaxation) is the mitral flow velocity (E/A ratio) measured via Doppler echocardiography. The atria transfer blood to the ventricle in 2 phases: during the early phase (E wave) the weight of the blood causes it to pass into the ventricles passively while during the late phase the remaining blood is ejected into the ventricles via atrial contraction (A wave). The relative contribution of each is then expressed as the E/A. In healthy individuals the majority of blood is transferred to the ventricles during early phase. A more sensitive measure for the diastolic function includes the E/E', which is the ratio between the early mitral inflow velocity (E wave) and early diastolic velocity of mitral annulus (E'; myocardial relaxation) [1]. The E/E' ratio is of great importance for the prediction of the left ventricular filling pressure. An increase in this ratio is found in diastolic heart failure.

In HFpEF the heart contracts normally, but due to stiffness of the ventricles they can no longer properly relax [2-4]. Less blood is then able to enter the ventricles during diastole (relaxation) so the duration of the relaxing phase is longer in HFpEF, in this case the EF may be normal. During physical exercise, the heart is therefore not able anymore to meet the requirement of the body to pump more blood and symptoms may be unmasked. Almost 50% of all HF patients demonstrate symptoms of heart failure in the presence of a preserved EF.

To summarize, the EF is reduced in HFrEF due to a reduced contractile response of the left ventricle causing less blood to be ejected out of the heart during each contraction. In contrast, in HFpEF the EF is preserved, but the diastolic function is impaired due to stiffness of the ventricles. At rest this will not cause many problems, however during exercise symptoms will emerge.

Until now the most attention has been paid to the causes and many therapeutic interventions have been developed for HFrEF, however less is known about HFpEF. Like HFrEF, HFpEF is associated with high mortality: in-hospital mortality rates ranges from 3.0 to 6.5%, whereas short term (30-90 days) and long term mortality (5 years) rates range from 5.0-9.5% and 55-74% respectively [5]. An improved mechanistic understanding would improve the development of new therapeutics but this is complicated by the heterogeneity of the patient population. The HFpEF population is characterized by multiple comorbidities such as obesity, diabetes, hypertension and chronic kidney disease (CKD) [6, 7]. A worsened renal function or CKD is highly prevalent in HFpEF, in approximately 26-53% of the patients [8]. The combination of CKD and HFpEF is also considered as the **metabolic cardiorenal syndrome** (CRS). The importance of the connection between renal function and HF is increasingly acknowledged among both cardiologist and nephrologists as in a substantial population of HF patients also suffering from CKD, the renal dysfunction is a strong predictor in HF prognosis. Vice versa, CKD is associated with an increased risk of cardiac mortality



[9-14]. Even in early stages of CKD (1 and 2), the risk for HF and mortality is augmented by 10- to 30-fold. In later stages of CKD (3 and 4) the risk of HF mortality is even higher than the risk of reaching end-stage renal disease (ESRD) and the requirement of renal transplant, accounting for 40-50% of all death in this particular patient group. In ESRD, the risk of cardiac death is increased by more than 10-fold in comparison to age and gender matched controls in the general population. Consequently, the prevention of the onset and progression of HFpEF is a major issue for patients suffering from CKD.

**Rationale for mechanistic research on metabolic CRS:** Despite much information on the incidence and symptoms of CRS, little is known about the molecular drivers of CRS in general and of metabolic CRS in particular. Thus, symptoms can be treated, but we cannot successfully combat the relentless progress of the syndrome. We hypothesize (see figures in section 3.2) that functional and structural changes in the microvasculature (capillaries) precede the development of the first phase of heart failure, namely HFpEF. In this phase the heart dilates and hypertrophies in order to maintain cardiac output per stroke (EF). This adaptation results in inadequate diastole and hence increasing end-diastolic pressure within the ventricles. When HF progresses systolic function is also compromised and HF progresses towards HFrEF. Importantly, while treatment options and subsequent clinical outcome have been improved over the years in patients with HFrEF, this is not true for HFpEF patients, for who therapeutic options remain limited [12]. Novel diagnostic and prognostic tools as well as new therapies for HFpEF, based on a thorough understanding of the underlying mechanisms, are therefore urgently needed.

Thus fundamental research on the initial changes in the capillary endothelium of the heart and their relation to HFpEF is required in order to interrupt the underlying mechanism. The three biological compartments (inflammation, microvascular dysfunction and cardiac adaptation) are strongly influenced by other systemic, in particular metabolic, circulating factors. In CKD patients, interactions with other interrelated comorbidities such as diabetes and hypertension, as well as non-traditional renal specific mechanisms, may produce microvascular dysfunction.

Moreover, also in the chronically diseased kidney functional and structural changes in the capillaries are an early event probably occurring before the disease becomes symptomatic. However, whether the same factors play a role in the microvascular/endothelial disturbances in both organs is also not clear. Thus whether patients with metabolic CRS require a specific therapeutic approach that is fundamentally different from the treatment used in patients with either CKD or HF alone is still hotly debated.

**Rationale for chosen experimental design:** In a series of experiments in a rodent model developing metabolic CRS, we will study the molecular mechanisms governing the relation between endothelial dysfunction and CKD that leads to HFpEF and vice versa. Current animal models focus primarily on a single morbidity while metabolic CRS is a multimorbid disease. Therefore we will develop and characterize a **new multimorbidity rodent model** that better corresponds to the patient population. This model combines a genetic rat strain with predisposition to obesity, hypertension and diabetes with the provision of a high salt diet and exogenous mineralocorticoid hormone to exacerbate fluid retention. Initially we will titrate and optimize this model to develop reproducible outcomes representing either 'mild' or 'marked' CRS. *In vivo* we will longitudinally monitor both renal and cardiac function in these animals in a series

of intertwined experiments, focussing on the coronary vasculature (endothelium) and on different parameters of diastolic heart function measured by Doppler-Echocardiography, such as the E/A mitral flow velocity (E/A ratio) and the E/E' ratio for estimation of the left ventricular filling pressure.

After the characterization **Step 1**, we will test the effect of circulating factors associated with CKD on disease development and progression. These factors will be derived from known literature and patient experiments conducted in work packages 1 and 2 of the RECONNECT consortium. By adding (**Step 2**) and removing (**Step 3**) these factors we will be able to monitor aggravation or alleviation of metabolic CRS-derived symptoms. In the end, we will also test new drugs derived from the results of Step 2 and 3 (**Step 4**). This flow will allow us to functionally evaluate novel pharmacological and cell-based therapeutic strategies in relation to endothelial changes at different stages of the disease process.

1. Nagueh, et al. "Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography." *Journal of the American Society of Echocardiography* 22.2 (2009): 107-133.
2. Desai & Fang. Heart failure with preserved ejection fraction: hypertension, diabetes, obesity/sleep apnea, and hypertrophic and infiltrative cardiomyopathy. *Heart Fail. Clin.* 2008;4:87-97
3. Go et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2013;127:e6-e245
4. Owan et al. Trends in prevalence and outcome of heart failure with preserved ejection fraction. *N. Engl. J. Med.* 2006;355:251-59
5. Lam et al. Epidemiology and clinical course of heart failure with preserved ejection fraction. *Eur. J. Heart. Fail.* 2011;13:18-28.
6. Boonman-de Winter, et al. "Prognosis of screen-detected heart failure with reduced and preserved ejection fraction in patients with type 2 diabetes." *International journal of cardiology* 185 (2015): 162-164.
7. El-Atat et al. The relationship between hyperinsulinemia, hypertension and progressive renal disease. *J Am SocNephrol.* 2004;15:2816-27
8. Sharma & Kass. "Heart failure with preserved ejection fraction mechanisms, clinical features, and therapies." *Circulation research* 115.1 (2014): 79-96.
9. Damman & Testani. The kidney in heart failure: an update. *EurHeart J.* 2015;36:1437-44
10. Damman et al. Renal impairment, worsening renal function, and outcome in patients with heart failure: an updated meta-analysis. *Eur Heart J.* 2014;35:455-69
11. Braam et al. Cardiorenal syndrome—current understanding and future perspectives. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10:48-55
12. Hatamizadeh et al. Cardiorenal syndrome: pathophysiology and potential targets for clinical management. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9:99-111
13. Lekawanvijit et al. Cardiorenal syndrome: the emerging role of protein-bound uremic toxins. *Circ Res.* 2012;111:1470-83
14. Dickhout et al. Interrelationship between cardiac hypertrophy, heart failure, and chronic kidney disease: endoplasmic reticulum stress as a mediator of pathogenesis. *Circ Res.* 2011;108:629-42

### 3.2 Purpose

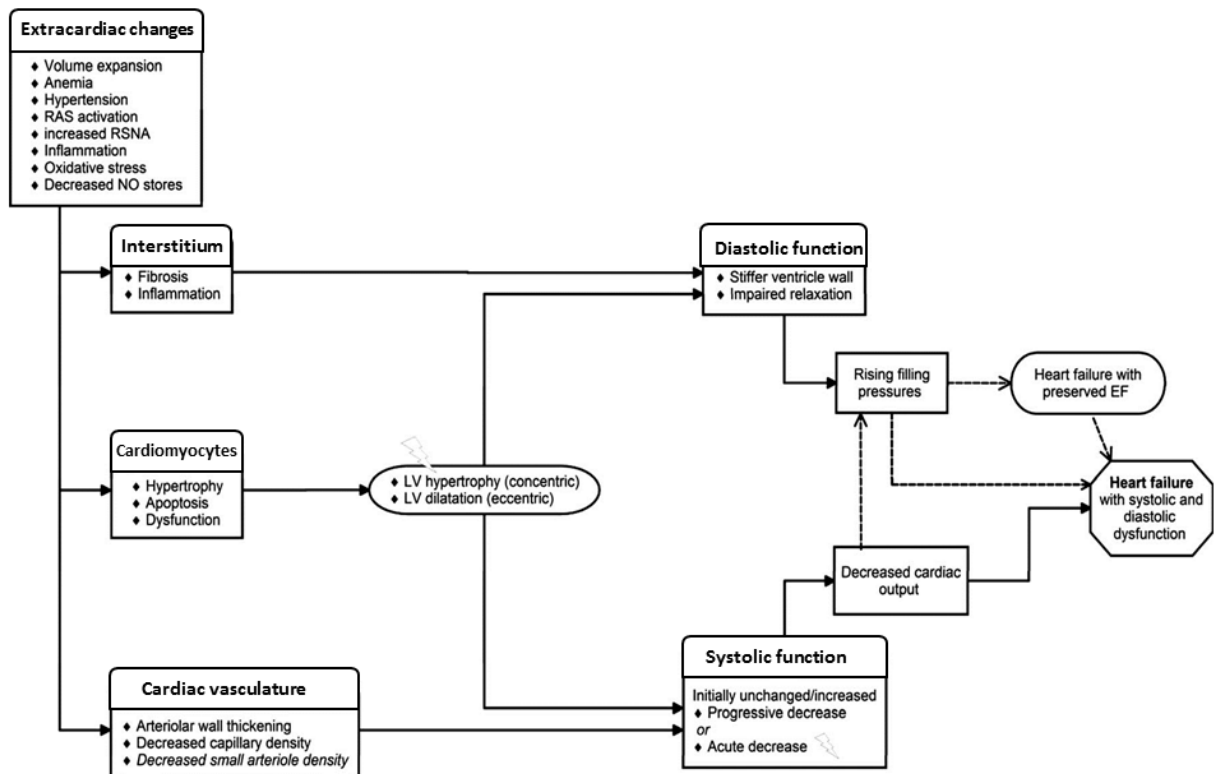
Describe the project's main objective and explain why this objective is achievable.

- 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?

We will test the hypothesis that CKD and its systemic consequences adversely impact the coronary microvasculature, modifying pathophysiology and vice versa that HF also impacts on the renal (glomerular and peritubular) microvasculature. Our **first aim** is to **morphologically and functionally define** microvascular dysfunction leading to HF with preserved ejection fraction (HFpEF) (figure 1), using an obese diabetic rodent model with or without increased dietary salt intake plus exogenous mineralocorticoid in order to study this process at different levels of severity (model development and characterization). Our **second aim** is to study the **molecular mechanisms** of these morphological and functional microvascular factors and evaluate the **effects**

of targeting such newly identified factors drug *in-vivo* in the mild and marked CRS models.

Aims of the proposed studies are highly achievable as they are or will form parts of large consortia. The first is RECONNECT, a consortium of 5 academic hospitals, funded by the Dutch Heart Foundation (NHS) (<http://www.reconnect-umc.eu/>). Lead partners are the department of Nephrology & Hypertension at the UMCU and the department of experimental cardiology at the

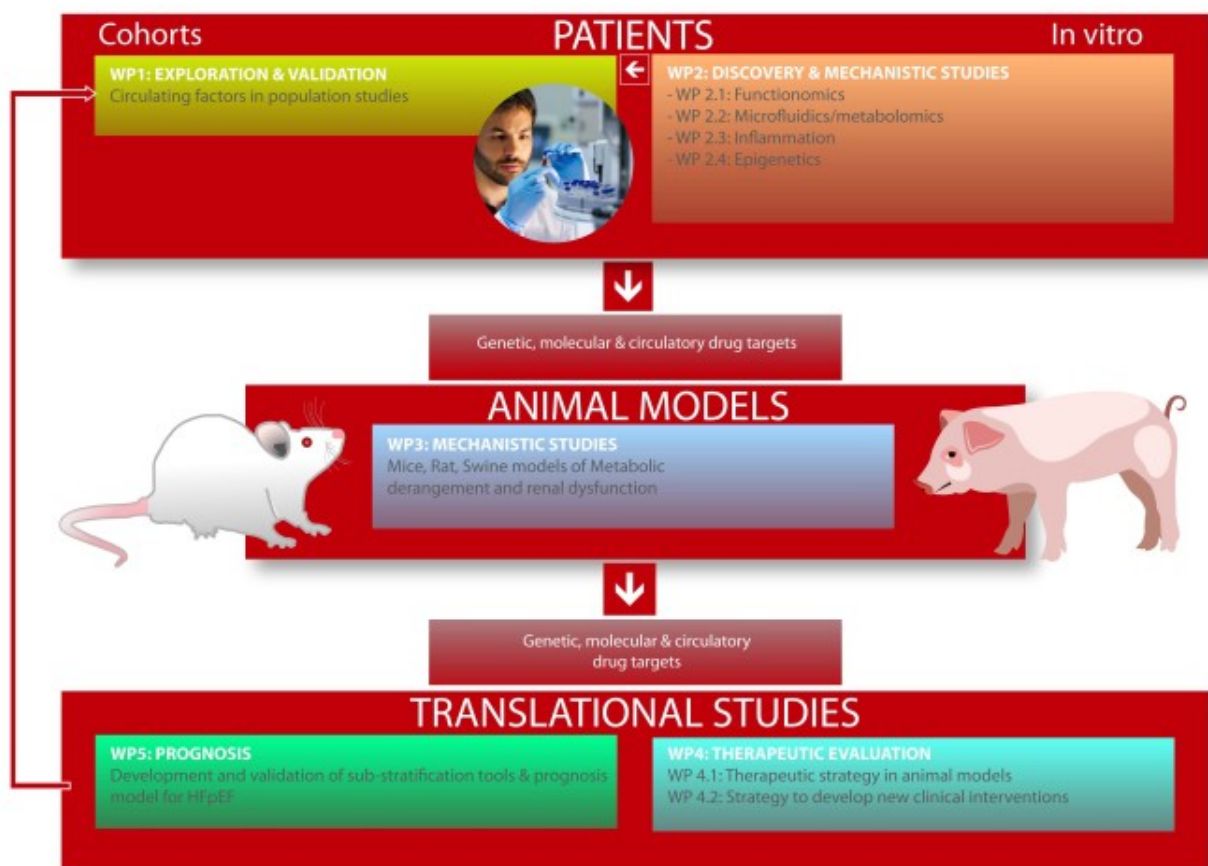


EUMC. Other partners include Experimental Cardiology at the UMCU and multiple other basic science and clinical partners at the UMCU, [REDACTED].

**Figure 1. Cardiac consequences of renal failure.** Loss of renal function causes activation and derangement of sympathetic, neurohormonal, metabolic, and hemodynamic pathways, leading to damage and dysfunction of the cardiac interstitial tissue, the cardiomyocytes, and the vasculature. Compensatory mechanisms like hypertrophy and dilatation initially maintain ejection fraction (EF) and cardiac output. With advancing damage, diastolic as well as systolic dysfunction may occur in the long term. An acute insult (flash), like myocardial infarction, results in aggravated damage and loss of function. This leads to worsening heart failure and decompensation. RAS, renin-angiotensin system; RSNA, renal sympathetic nerve activity; NO, nitric oxide; LV, left ventricular. Bongartz et al. Am J Physiol Renal Physiol. 2012;303:F1253-63].

The position of the proposed studies in RECONNECT is as follows. Candidate pathogenic factors and “drugable” targets will be identified in large databases available to the consortium (Work package (WP) 1). Next these factors and targets will be extensively validated *in vitro* in cell and tissue culture experiments (WP2). However, such validation studies cannot assess the effects on whole organ kidney and heart function or systemic effects in the whole organism. Consequently, promising pathogenic (WP3) and therapeutic (WP4.1) candidates will be evaluated *in vivo* in the validated rodent models of mild and marked metabolic CRS outlined below (3.4.2). These models

will reveal complimentary candidates that will then be used to develop a strategy for clinical interventions (WP4.2), and a prognostic model (WP5). These steps are illustrated in figure 2. In all our projects clinical data and *in vitro* data will also be generated to help identify the targets for animal experiments and ultimately clinical trials. All in all, this strategy will lead to a reduction in the use of animals because the animal experiments are not a goal in themselves but are an essential translation tool from *in vitro* to the clinic. Future applications will be submitted to the Dutch Kidney Foundation (NSN), and the EU.



**Figure 2. RECONNECT Workflow.** The workflow of the RECONNECT consortium is composed of 3 main themes: patient studies, mechanistic animal studies and translational studies. The proposed research program and the composition of our consortium ensure robust connections and interactions between basic, translation, and clinical epidemiology research activities. **The large animal (porcine) model is being developed at the department of Experimental Cardiology at the EUMC and will not fall under this license.**

### 3.3 Relevance

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

**Societal:** The combination of chronic kidney disease (CKD) and HFpEF is associated with adverse prognosis. Although clinical studies hint at a specific bidirectional interaction between HFpEF and CKD, fundamental insight in the pathogenesis of the metabolic CRS remains limited [1, 2]. Partially due to a lack of animal models representing this patient population, specific treatment options for this severely threatened patient population addressing the causal processes are not available, and all we have is symptomatic relief.

**Scientific:** Recent insights indicate that microvascular disturbances within the target-organs play a central role in the relentless prognosis of both CKD [3] and HFpEF [4]. Furthermore, once CKD is established this leads to progressive microvascular dysfunction in the heart and elsewhere [5]. Conversely, HF also affects kidney microvascular structure and function. We hypothesize that several factors importantly contribute to microvascular dysfunction and progression of metabolic CRS.

**Mechanistic:** Metabolic CRS in our often obese and diabetic patients manifests itself first with CKD and diastolic HF; that is a stiffer heart with reduced diastolic filling but preserved EF (HFpEF). At rest these patients show some fluid retention and mild exercise intolerance. Such HF can progress to more severe edema and exercise intolerance and finally to reduced systolic output (HFrEF). This project will enhance our insight in the metabolic CRS, i.e. renal drivers of HFpEF, as well as the effects of HFpEF on CKD, allowing new personalized therapeutic solutions for patients with the metabolic CRS. With our studies we aim to generate data on pathogenic relations between CKD and HFpEF, focusing on endothelial changes in the capillaries in the phase of the disease that the EF is preserved (see sections 3.1 and 3.2 for rationale and aims of the project respectively). We aim to find new prognostic markers for early disease detection and the identification of putative drug targets for future therapy development. Our current proposal will allow us to accurately and effectively investigate known and yet-to-be-identified circulating factors associated with CKD and HFpEF. By testing their potential to aggravate (by addition) or alleviate (by removal) disease development and progression, we may be able to select potential new drug candidates.

1. Bongartz et al. Target organ cross talk in cardiorenal syndrome: animal models. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;303:F1253-63.
2. Whaley-Connell et al. Pathophysiology: the cardiorenal metabolic syndrome. *J Am SocHypertens.* 2014;8:604-6.
3. van Koppen et al. Healthy bone marrow cells reduce progression of kidney failure better than CKD bone marrow cells in rats with established chronic kidney disease. *Cell Transplant.* 2012;21:2299-312
4. Paulus & Tschöpe. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodelling through coronary microvascular endothelial inflammation. *J Am CollCardiol.* 2013;62:263-71.
5. Bongartz et al. Subtotal nephrectomy plus coronary ligation leads to more pronounced damage in both organs than either nephrectomy or coronary ligation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302:H845-54.

---

### 3.4 Research strategy

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

CRS patients commonly present with multiple co-morbidities, whereas animal models usually focus on a single co-morbidity. We will utilize the obese diabetic Zucker fatty/Spontaneously hypertensive heart failure F1 hybrid (ZSF1) rat, an obese rodent model that combines obesity, hypertension, diabetes to assess their contribution as well as their interaction in the development and progression of metabolic CRS. Initially this model develops renal disease, and subsequently HFpEF [1, 2].

The Steps described below have been designed to support causality for an identified factor and the phenotype using Koch's classic postulates demonstrating association, temporal relation, induction and reversal.

**Step 1:** This obese rodent model **and its lean counterpart** will be subjected to a pharmacological and dietary model that leads to fluid retention and hypertension, namely desoxycorticosterone

acetate (DOCA) plus dietary salt. Fluid retention and hypertension are key elements of metabolic CRS and therefore an essential part of the model. DOCA plus dietary salt is known to induce mild diastolic heart failure (HFpEF) in laboratory rats [3]. This approach implies that in step 1 we will fully characterize obese ZSF1 and lean ZSF1 control rats without and with DOCA+salt. Important aspects of this definition are morbidity and mortality prior to the addition of DOCA+salt (see section 3.4.2) and at the end of follow-up. Step 1 will be performed in parallel in male and female rats.

**Steps 2 and 3:** From these four groups we will select two groups, one obese mild and an obese marked CRS model, to study known (neurohumoral & inflammatory factors, uremic toxins, oxidative stress) and novel CKD-and HFpEF-associated circulating factors (derived from biobanks of multiple well-defined patient cohorts in WP1 and WP2, see 3.2) and their causal roles in coronary and renal microvascular dysfunction and pathogenesis of CKD and HFpEF. By adding these factors in the model with mild symptoms (**Step 2**) and removing or blocking these factors in the model with marked symptoms (**Step 3**) we will be able to monitor aggravation or alleviation of metabolic CRS-derived symptoms.

. A **no-go** criterium is the development of persistent HFrEF ( ), shallow breathing and/or severe weight loss (more than 15% of the body weight at 3 months of age, which is a lot for an obese rat). Note, during the development and progression of CRS edema formation (primarily ascites) may occur, which will cause a small weight gain. Body weight will therefore be closely monitored during the experiment, taking this into account.

**Monitoring:** Renal and systemic hemodynamic parameters will be regularly monitored in addition to echocardiographic evaluation to obtain a clear view of cardiac and renal functional changes over time. Besides mechanistic studies, we will regularly sample urine and blood from our animals and relate these to terminal tissue samples in order to evaluate circulating culprits linked to pathogenic pathways.

**Step 4:** Finally, we will target these validated factors with conventional and novel drugs in the selected group of ZSF1 rats, i.e in obese rats with marked metabolic CRS.

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.

An outline of the different components of this project:

**Step 1: Model characterization and optimization.**

We will characterize structural and functional changes in the heart and kidney with a focus on the microvasculature in a genetic rat model (obese ZSF1 rat) combined with a pharmacological plus dietary model (DOCA + dietary salt). The objective is to achieve a 'mild' and a 'marked' model of chronic kidney disease (CKD) and heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) in the obese ZSF1 rat. A longitudinal protocol is designed to track cardiac left intraventricular pressure, cardiac function and dimensions (by echocardiography, tail-cuff plethysmography) and renal function (blood and urine samples) regularly in obese and lean control ZSF1 rats. A subgroup will be implanted with a telemetry device in order to measure left ventricular diastolic pressure in

freely moving rats. Some of these rats will also be treated with DOCA + dietary salt to retain fluid. [REDACTED] DOCA (via subcutaneous pellet) and dietary salt will be administered [REDACTED]. A **no-go** is more than 10% mortality prior to start of DOCA + dietary salt.

### **Step 2: Studying effects of adding known and novel CKD-and HF-associated circulating factors in mild metabolic CRS**

We will test the most promising pathogenic targets previously validated in the patient databases and in *in vitro* analyses of the workpackages 1 and 2 from the RECONNECT study (see 3.2 figure 2) in our stable 'mild' and 'marked' CRS rodent models obtained from Step 1. These factors are not yet known, but will be provided by work packages 1 and 2 during the course of the project. Examples of factors which might be involved in progression of CRS are vasoconstrictors, inflammatory factors, growth factors (such as FGF23), matrix forming proteins or uremic toxins. We will assess whether administration of these identified factors will aggravate the disease progression in the mild CRS model. The marked CRS model will serve here as positive control. The administration of these factors will start at defined levels of renal and cardiac injury derived from the first step. Longitudinal measurements will be performed to determine cardiac function and dimensions and renal function and in a subgroup a telemeter will be implanted to measure left ventricular diastolic pressure 24/7.

The route of administration depends on the factors itself, if it concerns a peptide a subcutaneously implanted osmotic pump will be used while when a lipophilic factor is involved it will be given orally. The same applies for the dosage and frequency at which the factors will be administered in the animals. A **no-go** criterium is persistent HFrEF ([REDACTED]), shallow breathing and/or weight loss (more than 15% of the body weight at 3 months of age).

### **Step 3: Studying effects removing known and novel CKD-and HF-associated circulating factors in marked metabolic CRS**

Subsequently, we will remove or block the identified circulating factors provided from the work packages 1 and 2 in our stable marked CRS model and observe if we can alleviate the disease progression towards a milder phenotype. The mild CRS model will serve in this step as reference for the mild phenotype. Again longitudinal measurements will be performed to determine cardiac function and dimensions and renal function and in subgroups a telemeter will be implanted to measure left ventricular diastolic pressure 24/7.

### **Step 4: Drug testing phase**

We will assess whether intervention with target-specific drugs based on the results of Step 2 and 3 will limit renal and coronary overall and microvascular dysfunction. Drug efficacy studies in our marked CRS model will provide evidence for the suitability of these interventions for targeted therapy for specific co-morbidity subgroups of CKD-HFpEF patients. These interventions will also start at defined levels of renal and cardiac injury derived from Step 1. A **no-go** criterium is persistent HFrEF ([REDACTED]), shallow breathing and/or weight loss (15% of the body weight at 3 months of age).

Training of the different techniques is also required to minimize mortality in the animals due to technical failures. Therefore techniques such as blood sampling, echocardiography, imaging of the microvasculature, tail-cuff plethysmography, implantation of telemetric catheters into the left

ventricle for measuring left intraventricular diastolic pressure and the terminal experiment to assess renal function will be practised in both lean as well as obese animals. Due to differences in body composition, surgical interventions in lean (males +/- 500g) and obese (males +/- 800g) may require different techniques.

1. Hamdani et al. Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model. *Circ Heart Fail* 2013;6:1239-49.
2. Bilan et al. Diabetic nephropathy and long-term treatment effects of rosiglitazone and enalapril in obese ZSF1 rats. *J Endocrinol* 2011;210:293-308.
3. Ogata et al. Myocardial fibrosis and diastolic dysfunction in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats is ameliorated by the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha activator fenofibrate, partly by suppressing inflammatory responses associated with the nuclear factor-kappa-B pathway. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:1481-8.

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.

**Step 1:** characterisation of functional and structural endothelial changes at different stages of the disease process. To this end, we will develop two models one representing mild CRS and one marked CRS. This is the first milestone.

**Step 2 and 3:** validation of **pathogenic factors** in the models characterised in Step 1 representing mild and marked CRS **inducing** functional and structural endothelial changes at different stages of the disease process. To this end we will both **administer (Step 2)** and **block or remove (Step 3)** these factors. This is the second milestone.

**Step 4:** characterisation of **druggable therapeutic factors** in a well-defined model representing marked CRS **ameliorating** functional and structural endothelial changes at this stage of the disease process. These (probably novel) drugs will be selected based on the results of steps 2 and 3. This is the third and last milestone. **The four steps are consecutive.**

Our ultimate goal is to translate the mechanistic insight in metabolic CRS in relation to endothelial changes at different stages of the disease process, generated by step 1-3, into prognostic and therapeutic interventions.

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             | Cardiac and renal function and structure in the obese ZSF1 rat |
| 2             |  |
| 3             |  |
| 4             |  |
| 5             |  |
| 6             |  |
| 7             |  |
| 8             |  |
| 9             |  |
| 10            |  |





## Appendix

### Description animal procedures

- This appendix should be enclosed with the project proposal for animal procedures.

#### 1 General information

|   |               |   |
|---|---------------|---|
| 1.1 Provide the approval number of the 'Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority'.  | 11500         |   |
| 1.2 Provide the name of the licensed establishment.   | UMC Utrecht   |   |
| 1.3 List the serial number and type of animal procedure.<br><br><i>Use the serial numbers provided in Section 3.4.4 of the Project Proposal form.</i> | Serial number | Type of animal procedure  |
|   | 1             | Cardiac and renal function and structure in the obese ZSF-1 rat |

#### 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 ultimate aim of this project is to translate the mechanistic insight in cardiorenal syndrome, generated by several consecutive steps, into therapeutic (pharmacological and cell-based) interventions (see outline 3.4.2.). We will test the hypothesis that impaired kidney function and its systemic consequences adversely impact the coronary microvasculature, modifying pathophysiology and vice versa that HF also affects the renal microvasculature. Our strategies will help to elucidate the mechanistic pathways involved in the pathogenic cross-talk between renal drivers, systemic inflammation, microvasculature, and renal and cardiac parenchymal cells leading to progressive CKD, HF (HFpEF), and combined models of CKD plus HFpEF. The individual steps are connected as follows:

##### Step 1: Model characterization and optimization.

We want to characterize the obese Zucker fatty/Spontaneously hypertensive heart failure F1 hybrid (ZSF1) rats with and without added (desoxycorticosterone acetate) DOCA plus dietary salt compared to the lean ZSF1 controls. Fluid retention and hypertension are key elements of metabolic cardiorenal syndrome (CRS) and therefore an essential part of the model. DOCA plus dietary salt is known to induce mild diastolic heart failure (HFpEF) in laboratory rats [3]. Initially the obese ZSF1 model develops renal disease, and subsequently HFpEF [1, 2]. In **Step 1**, we will fully characterize 4 experimental groups with the ultimate goal to titrate experimental settings to such an extent that reproducible and representative models of 1) stable mild metabolic CRS (mild HFpEF) and 2) stable marked metabolic CRS (marked HFpEF) in the obese ZSF1 rat can be obtained.

Characterizing and optimizing our model is necessary since no representative animal models exist with CKD-induced HFpEF that reflects the multimorbid state of HFpEF patients. As mentioned, most animal models focus on a single morbidity, which does not fully represent the clinical manifestations of the patient. By optimizing a multimorbid model, we will 1) be able to mimic patient pathology more accurately, and 2) introduce a new model to the cardiovascular scientific field that may have broader but more accurate applications than the currently available rodent models.

[4, 5]. This will mean that the experimental concentrations of DOCA and dietary salt may need to be adjusted to obtain the desired output parameters ( ). Initially, DOCA will be time-released by a subcutaneously implanted pellet plus dietary salt will be mixed into the ground chow (6% w/w).

Primary outcome parameters for model characterization and optimization will be tracked longitudinally and consist of measuring the intraventricular pressure, cardiac function and dimensions and the renal function. Functional heart measurements will thus provide us with information about the impact disease development and progression has on cardiac output and specifically on the coronary microvasculature. After a terminal renal function experiment, *ex vivo* analysis will be performed to assess organ and tissue damage (e.g. heart, kidney and (coronary) vasculature using qPCR, Western Blot and immunohistochemistry) among others.

In parallel to **Step 1**, *in vitro* experiments will be performed on patient samples. Pilot data have confirmed that circulating factors associated with CKD induce a microvascular response. Future results will be linked to and incorporated in the set-up of the animal experiments while reciprocally *in vitro* experiments may be performed on animal samples (e.g. organ-derived cells, blood) to further optimize the model.

### **Step 2: Studying effects of adding known and novel CKD-and HF-associated circulating factors in mild metabolic CRS**

The work packages 1 and 2 of the RECONNECT study (see workflow 3.2.) will identify factors associated with CKD and HFpEF from the patient samples, which can serve as novel drug targets for the treatment of HFpEF. At the moment these factors are still unknown, however examples of these factors could be vasoconstrictors, inflammatory factors, growth factors ( ), matrix formation proteins or uremic toxins. The factors provided from work packages 1 and 2 will subsequently be implemented in our study to assess their efficacy in our animal models in a proof-of-mechanism study by first **adding** these identified factors in the stable mild CRS model and looking at aggravation of the primary outcome parameters (longitudinally measuring the intraventricular pressure, cardiac function and dimensions and renal function, in addition to *ex vivo* analyses). The mild model will be used to see if administering these factors will lead to a more severe phenotype similar to the marked CRS model. The marked CRS model is required in this step as the positive control. Specifically we want to assess whether administration of known and newly identified CKD-associated circulating factors aggravates renal and coronary overall and microvascular dysfunction at various stages of metabolic CRS. Depending on the progression and characterization of the stable mild model obtained in Step 1 we will determine the specific time point at which these factors will be administered. The route of administration relies on the nature of the factors, in the case of a peptide a subcutaneously implanted osmotic pump will be used while when a lipophilic factor is involved it will be given orally. Naturally, the dosage and frequency at which the factors will be administered in the animals is dependent on the properties of each factor.

### **Step 3: Studying effects of removing known and novel CKD-and HF-associated circulating factors in marked metabolic CRS**

Subsequently, we will **remove** the identified factors in the stable marked CRS model and monitor improvement of the primary outcome parameters in an identical set-up. The marked model will be used in this step to see if removing these factors alleviates its phenotype to the situation of the mild CRS model. The mild CRS model serves here as the reference value for the mild phenotype. In this part of the project, we will assess whether intervention of newly identified CRS-associated drug targets will limit renal and coronary

overall and microvascular dysfunction as well as onset and progression of HFpEF at various stages of CRS.

#### **Step 4: Drug testing phase**

Subsequent drug efficacy studies in the animal model with marked metabolic CRS background will provide evidence for the suitability of these interventions for targeted therapy for specific co-morbidity subgroups of CKD-HFpEF patients.

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

**Step 1** will deal with model characterization and optimization.

By using obese diabetic Zucker fatty/Spontaneously hypertensive heart failure F1 hybrid (ZSF1) rats with and without added (desoxycorticosterone acetate) DOCA and dietary salt in parallel with the lean ZSF1 controls, we will generate 4 main experimental groups.

- 1) Lean ZSF1
- 2) Lean ZSF1 + DOCA/dietary salt
- 3) Obese ZSF1
- 4) Obese ZSF1 + DOCA/dietary salt

Note that DOCA (administered by implanted s.c. pellet) is always combined with dietary salt. If necessary the model can be alleviated by reducing the dosage of DOCA, dietary salt or both. In this model we will titrate DOCA and dietary salt in obese ZSF1 rats until we reach the threshold of HFpEF, [REDACTED]. From this point on, the dosage of DOCA and dietary salt have to be lowered in order to obtain both a mild and a marked metabolic CRS model in obese ZSF1. Step 1 will be performed in parallel in male and female rats. Currently very little information is available on the phenotype of female lean and obese ZSF1 rats.

Primary outcome parameters for model characterization and optimization will be tracked longitudinally [REDACTED], starting in the adult life phase of the animal. [REDACTED]. This allows us to accurately follow the development and progression of the metabolic CRS with non-invasive or low-invasive measurements. We will monitor intraventricular pressure, cardiac function and dimensions in rest and the renal function. Longitudinal (non-invasive and low-invasive) measurements consists of echocardiography, collecting urine in metabolic cages for a maximum of 24 hours, determining systolic blood pressure by tail-cuff plethysmography, imaging the coronary microvascular bed, determining left ventricular pressure in subgroups of freely moving rats by telemetry (implanted left ventricular catheter with transmitter in the abdomen) and drawing blood. In a terminal experiment, renal function will be determined with gold-standard clearance methodology.

Microvasculature can be imaged by a multitude of techniques, including Doppler flow Imaging, microCT (Skyscan, VEVO) and MRI. In consultation with experts in the field, our collaborative partners and the IvD, we will determine which technique is the most feasible in the current project (e.g. invasiveness in repeated measures, quality of the measurements, availability).

Dietary salt will be provided by mixing through ground standard rodent chow, possibly in different concentrations, but with a starting concentration of 6%. DOCA will be provided through a subcutaneously implanted timed-release pellet (Innovation Research of America, pellets [REDACTED]). Placebo pellets will be subcutaneously implanted in the groups without DOCA and dietary salt. Consulting previous literature and talking to experts in the field will determine definite DOCA and salt concentrations.

**Step 1** will generate two experimental animal models; mild versus marked metabolic CRS in the obese ZSF1 rat, which have been optimized to generate reproducible results on multi-morbidity. Lean ZSF1 rats will function as controls.

In **Steps 2, 3 and 4** longitudinal measurements and their frequency will be similar to **Step 1**. The focus will

however be on aggravating or alleviating renal and coronary overall and microvascular dysfunction and onset and progression of HFpEF at various stages of CRS. Note that, because of unavoidable factors such as genetic drift in the breeders' colony as well as experience of the experimental crew, the untreated models will need to be included for each subsequent experiment.

All *in vivo* experiments will be followed by *ex vivo* and *in vitro* analyses. *Ex vivo* read-outs include:

- 1) vasoactive responses in isolated coronary arterioles, 2) cardiac/renal (immuno)histology,
- 3) gene/protein expression, 4) plasma and cells available for mechanistic studies in other work packages.

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

To avoid experimental variation, all main experimental groups in all Steps will be studied longitudinally in balanced cohorts. Before the start of an experiment, 'go/no go' moments of previous steps will be analysed, and if possible and available, additional results from *in vitro* and *ex vivo* experiments will be implemented to optimize experimental designs. Typical 'go/no go' decisions are based on humane endpoints (see below), achieving stable models of mild and marked metabolic CRS (Step 1), and identifying consistent responses of induction and reversal of typical CRS symptoms and post-mortem changes after addition or removal/blockade of identified factors (Steps 2 and 3 respectively).

In this current project there are multiple primary readout parameters, measured either longitudinally or obtained from a terminal experiment. After consultation with the cardiologist we have chosen for **the Doppler E/E'** (ratio of early mitral inflow velocity and early diastolic velocity of the mitral annulus) as the most important output parameter for the evaluation of diastolic function. The E/E' is of great importance for the prediction of the left ventricular filling pressure. Elevated filling pressures are main physiologic consequences of diastolic dysfunction [6].

For the subgroups of animals that will be implanted with the telemetry device, the primary readout parameter will be the left ventricular end diastolic pressure.

Note, the above-mentioned increases for the two primary parameters are specifically for comparison of the mild and the marked CRS models, these differences are not applicable between the healthy and the mild model.

While we focus on the coronary microvasculature in relation to the progression of CKD and HFpEF, we will use the distinctive models 'mild HFpEF' and 'marked HFpEF' since it is believed that even mild renal impairment causes metabolic and systemic derangements in circulating factors that introduce an activated systemic inflammatory state and microvascular dysfunction, which may be aggravated in models of severe HFpEF. We will use adult animals because the model, both 'mild' and 'marked' CRS will take time to develop [7].

We do expect to reach humane endpoints (HEPs) due to model-related complications e.g. shortness of breath combined with renal failure in a chronic experimental setting, see also **Humane Endpoints**.

However, we do not expect interim-mortality since longitudinal measurements may help us to prematurely take animals out of the study that are expected to experience an increased distress. Cumulatively, we expect to reach HEPs in 10% of the animals with mild CRS, thus 90% survival, with HEPs primarily due to technical problems related to anesthesia required for longitudinal measurements and telemeter implantation and in 25% of the animals with a maximum of marked CRS, thus 75% survival, primarily due to the same technical problems, but also shallow breathing or severe weight loss (more than 15% of body weight at 3 months of age). Note, during the development and progression of CRS edema formation (primarily ascites) may occur, which will cause a small weight gain. Body weight will therefore be closely monitored during the experiment, taking this into account.

In **Step 1a**, we will look at a maximum of 8 experimental groups.

- 1) Lean ZSF1
- 2) Lean ZSF1 + DOCA and dietary salt 6%
- 3) Lean ZSF1 + DOCA and dietary salt % unknown

- 4) Lean ZSF1 + DOCA and dietary salt% unknown.2
- 5) Obese ZSF1
- 6) Obese ZSF1 + DOCA and dietary salt 6%
- 7) Obese ZSF1 + DOCA and dietary salt % unknown
- 8) Obese ZSF1 + DOCA and dietary salt % unknown.2

With an effect size ( $f$ ) = 0.25, Power = 0.9 and alpha = 0.05, number of longitudinal measurements = 8, correlation among repeated measurements = 0.2, corrected for 8 experimental groups, we calculated a priori the number of animals necessary using F-test for ANOVA: repeated measures, between factors. **The outcome was N = 96**, specific for the readout parameter E/E', meaning we would like to conduct this experiment with **N = 12 animals per experimental group**, which should have significantly different clinical manifestations in the disease spectrum. We believe that the calculated outcome predicts a sufficient amount of animals needed to see differences between the groups, even with variation in disease progression due to differences in genetic background.

In Step 1a we will look at the characterization and progression of CRS in both male as well as female ZSF1 rats, because not much is known about the CRS phenotype in the female animals compared to the male rats. Depending on the outcomes of this step, we will decide whether we proceed with the male or female animals for the following steps. A crucial aspect in this decision is that we need to acquire both the stable 'mild' and the 'marked' CRS model in these animals in the chosen time-frame in order to be able to answer our research question. Therefore the number of animals in Step 1a will be **duplicated** to include both male and female ZSF1 rats.

In **Step 1b**, we will further characterize the 2 main experimental groups derived from **Step 1a** and the control groups **with telemetry**. Thus the outcomes of Step 1a will serve as input for Step 1b.

- 1) Mild CRS in obese ZSF1 rats
- 2) Marked CRS in obese ZSF1 rats
- 3) Healthy lean ZSF1 rats
- 4) Lean ZSF1 rats with mild conditions

**Note that it is impractical and too expensive to instrument all 8 groups described in 1a. Telemetry in this instance will provide us with an infinite amount of measurements, since these will be taken 24/7 during this experiment. As a trivial number, the number of measurements is set to 20.**

With an effect size ( $f$ ) = 0.50, Power = 0.9 and alpha = 0.05, number of longitudinal measurements = 20, correlation among repeated measurements = 0.2, corrected for 4 experimental groups, we calculated a priori the number of animals necessary using F-test for ANOVA: repeated measures, between factors.

**The outcome was N = 20** specific for the readout parameter left ventricular end diastolic pressure, meaning we would like to conduct this experiment with **N = 5 animals per experimental group**.

In **Step 2a**, we will **administer** known and novel CKD-associated circulating factors in a mild model of metabolic CRS. In Step 2, we would like to investigate whether or not these factors can **aggravate** disease progression. The marked CRS model will serve as a positive control. We will test a maximum of 8 factors with 2 factors per cohort. Therefore, we will generate a total of **16 experimental groups**.

- 1) Mild CRS
- 2) Mild CRS + circulating factor1
- 3) Mild CRS + circulating factor2
- 4) Marked CRS

Again, we will use the E/E' as our primary readout parameter.

With an effect size ( $f$ ) = 0.25, Power = 0.9 and alpha = 0.05, number of measurements = 8, correlation among repeated measurements = 0.2, corrected for 16 experimental groups, we calculated a priori the number of animals necessary using F-test for ANOVA: repeated measures, between factors.

**The outcome was N = 128**, specific for the readout parameter E/E', meaning we will have **N = 8 animals per experimental group**.

In **Step 2b**, we will further investigate **administration** of the 2 most promising circulating factors derived from **Step 2a**, the untreated group and the positive control **with telemetry**. Thus the outcomes of Step 2a will serve as input for Step 2b.

- 1) Mild CRS
- 2) Mild CRS + factor 1
- 3) Mild CRS + factor 2
- 4) Marked CRS

**Note that it is impractical and too expensive to instrument all 16 groups described in 2a. Telemetry in this instance will provide us with an infinite amount of measurements, since these will be taken 24/7 during this experiment. As a trivial number, the amount of measurements is set to 20.**

With an effect size ( $f$ ) = 0.50, Power = 0.9 and alpha = 0.05, number of longitudinal measurements = 20, correlation among repeated measurements = 0.2, corrected for 4 experimental groups, we calculated a priori the number of animals necessary using F-test for ANOVA: repeated measures, between factors.

**The outcome was N = 20** specific for the readout parameter left ventricular end diastolic pressure, meaning we would like to conduct this experiment with **N = 5 animals per experimental group**.

In **Step 3a**, we will **remove** known and novel CKD-associated circulating factors in a marked model of metabolic CRS. In Step 3, we would like to investigate whether or not these factors can **alleviate** disease progression. The mild CRS model will serve here as the reference value for the mild phenotype. We will test a maximum of 8 factors with 2 factors per cohort. Therefore, we will generate a total of **16 experimental groups**.

- 1) Marked CRS
- 2) Marked CRS + circulating factor1
- 3) Marked CRS + circulating factor2
- 4) Mild CRS

Again, we will use the E/E' as our primary readout parameter.

With an effect size ( $f$ ) = 0.25, Power = 0.9 and alpha = 0.05, number of measurements = 8, correlation among repeated measurements = 0.2, corrected for 16 experimental groups, we calculated a priori the number of animals necessary using F-test for ANOVA: repeated measures, between factors.

**The outcome was N = 128**, specific for the readout parameter E/E', meaning we would like to conduct this experiment with **N = 8 animals per experimental group**.

In **Step 3b**, we will further characterize **removal** of the 2 most promising circulating factors derived from **Step 3a** and the untreated group and our mild control (reference value) **with telemetry**. Thus the outcomes of Step 3a will serve as input for Step 3b.

- 1) Marked CRS
- 2) Marked CRS + factor1
- 3) Marked CRS + factor2
- 4) Mild CRS

**Note that it is impractical and too expensive to instrument all 16 groups described in 3a. Telemetry in this instance will provide us with an infinite amount of measurements, since these will be taken 24/7 during this experiment. As a trivial number, the amount of measurements is set to 20.**

With an effect size ( $f$ ) = 0.50, Power = 0.9 and alpha = 0.05, number of longitudinal measurements = 20, correlation among repeated measurements = 0.2, corrected for 4 experimental groups, we calculated a priori the number of animals necessary using F-test for ANOVA: repeated measures, between factors.

**The outcome was N = 20** specific for the readout parameter left ventricular end diastolic pressure, meaning we would like to conduct this experiment with **N = 5 animals per experimental group**.

In **Step 4a: Drug testing phase** we will drug target factors identified and characterized in steps 2 and 3. We will test a maximum of 8 drugs with 2 factors per cohort; however we will need to repeatedly include our

controls and our mild CRS control as a reference value because of unavoidable factors such as genetic drift in the breeder's colony as well as experience of the experimental crew. Therefore, we will generate a total of **16 experimental groups**.

- 1) Marked CRS
- 2) Marked CRS + candidate drug 1
- 3) Marked CRS + candidate drug 2
- 4) Mild CRS

Again, we will use the E/E' as our primary readout parameter.

With an effect size ( $f$ ) = 0.25, Power = 0.9 and alpha = 0.05, number of measurements = 8, correlation among repeated measurements = 0.2, corrected for 16 experimental groups, we calculated a priori the number of animals necessary using F-test for ANOVA: repeated measures, between factors.

**The outcome was N = 128**, specific for the readout parameter E/E', meaning we would like to conduct this experiment with **N = 8 animals per experimental group**.

In **Step 4b**, we will further characterize **efficacy** of the 2 most promising candidate drugs derived from **Step 4a** and the untreated group and the mild CRS (reference value) **with telemetry**. Thus the outcomes of Step 4a will serve as input for Step 4b.

- 1) Marked CRS
- 2) Marked CRS + drug 1
- 3) Marked CRS + drug 2
- 4) Mild CRS

**Note that it is impractical and too expensive to instrument all 16 groups described in 4a. Telemetry in this instance will provide us with an infinite amount of measurements, since these will be taken 24/7 during this experiment. As a trivial number, the amount of measurements is set to 20.**

With an effect size ( $f$ ) = 0.50, Power = 0.9 and alpha = 0.05, number of longitudinal measurements = 20, correlation among repeated measurements = 0.2, corrected for 4 experimental groups, we calculated a priori the number of animals necessary using F-test for ANOVA: repeated measures, between factors

**The outcome was N = 20** specific for the readout parameter left ventricular end diastolic pressure, meaning we would like to conduct this experiment with **N = 5 animals per experimental group**.

To minimize mortality in the sense of technical failure, training will be necessary to master implantation of telemeters (left ventricle), echocardiography, a yet to be determined microvasculature visualization technique, a terminal renal experiment. Due to differences in body composition, surgical interventions in lean (males +/- 500g) versus obese (males +/- 800g) ZSF1 rats, may require different techniques. We believe that, at all times, 1 technician and 1 PhD student should have mastered these skills, since 24h measurements collected by telemetry are part of our refinement strategy, as previously discussed in this protocol. A total of 3 persons (1 additional art. 12 or PhD student next to the previously stated 2 employees) will require training and education for this project. Due to the complexity of the surgery, an external training course in telemetry implantation at the René Remie Surgical Skills Centre will be followed to ensure that the needed skills are obtained. The knowledge of this course will be transferred to the involved persons in this project to expand the obtained knowledge at the department and the animal facility. In this way the surgeries can be performed by our own skilled staff during the whole course of this project so the quality of implantation can be guaranteed. This dispels the need to order already instrumented rats from external sources.

A difference between invasive and non-invasive methods will be made for the training. Invasive methods include blood sampling via puncture of the tail vein, telemetry implantation in the left ventricle, and the terminal experiment. Non-invasive methods include echocardiography, microvasculature imaging and tail-cuff plethysmography. To minimize the number of animals for training we choose to let the animals used for non-invasive methods to recover from the light inhalation-anesthesia so that they can be re-used.

Based on previous calculations and experience in how long training will take on average, we predict that we will need N = 150 animals (i.e. N = 50/person). The animals will be divided as followed, with the number of animals stated per type:

- N = 15 for blood sampling via tail vein and terminal experiment (combined practice)
- N = 25 for telemetry implantation into the left ventricle
- N = 5 for echocardiography, microvasculature imaging and tail-cuff plethysmography (combined practice of echocardiography and microvasculature imaging and re-use of animals)
- **Note:** in case the use of a subcutaneously implanted osmotic pump is required for administering of the circulating factors in Step 2 N = 5 animals will be used for training. If this technique is not required, training will not be necessary.

It will moreover be necessary to choose an optimal technique to measure the *in vivo* structure and function of the microvasculature. Due to differences in body composition, the preferred technique should function in both lean (males +/- 500g) and obese (males +/- 800g) ZSF1 rats. If possible and present, surplus animals will be used for training purposes and testing will be combined with training from [REDACTED] or telemetry implantation, allowing multiple techniques to be trained on a single animal.

1. Damman & Testani. The kidney in heart failure: an update. *Eur Heart J.* 2015;36:1437-44
2. Damman et al. Renal impairment, worsening renal function, and outcome in patients with heart failure: an updated meta-analysis. *Eur Heart J.* 2014;35:455-69
3. Braam, et al. Cardiorenal syndrome—current understanding and future perspectives. *Nat Rev Nephrol.* 2014;10:48-55
4. Bongartz, et al. "Subtotal nephrectomy plus coronary ligation leads to more pronounced damage in both organs than either nephrectomy or coronary ligation." *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 302.3 (2012): H845-H854
5. van Koppen, et al. "5/6th nephrectomy in combination with high salt diet and nitric oxide synthase inhibition to induce chronic kidney disease in the Lewis rat." *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 77 (2013): e50398-e50398).
6. Nagueh, et al. "Recommendations for the evaluation of left ventricular diastolic function by echocardiography." *Journal of the American Society of Echocardiography* 22 (2009): 107-133.
7. Hamdani et al. Myocardial titin hypophosphorylation importantly contributes to heart failure with preserved ejection fraction in a rat metabolic risk model. *Circ Heart Fail* 2013;6:1239-49
8. Babelova et al. Sex-differences in renal expression of selected transporters and transcription factors in lean and obese Zucker spontaneously hypertensive fatty rats. *J Diabetes Res.* 2015;2015:483238

## B. The animals

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

To minimize the variation in our primary readout-parameter  $E/E'$  and to approximate the adult heterogenic multimorbidity patient population with metabolic CRS as much as possible, the ZSF1 model + additional intervention (DOCA and dietary salt) is preferred. The ZSF1-Lepr<sup>fa</sup>Lepr<sup>cp</sup>/CrI rat is an outbred model and is bred by Charles River in Sulzfeld (G). We chose an outbred model due to the presence of genetic variability, representative of the human population. We will use adult animals [REDACTED] because the model, both 'mild' and 'marked' CRS, will take time to develop. [REDACTED]

Obese ZSF1 rats are known to exhibit only mild CRS at 20 weeks of age [7]. Addition of DOCA and dietary salt will allow us to tune this disease development and progression carefully. Currently, there is very little characterization present of the phenotype found in female ZSF1 rats. There is no information on cardiac function in female ZSF1 rats, but their renal injury appears to be milder than in males [8]. This is a common finding in laboratory rats. Therefore in Step 1A of this project we will start by using both male as well as female ZSF1 rats for the characterization and progression of CRS. Depending on the outcomes of the models in this step we will decide whether we proceed with male or female rats for the subsequent steps. An important aspect in this matter is that we need to acquire both the stable 'mild' and the 'marked' CRS model [REDACTED] in order to address our research question.

**Total N = 150** animals for training and education for 3 persons. If possible and available, surplus animals or animals from other protocols are used for training purposes.

For **Step 1a**, we need a terminal group size of N = 12 with 8 experimental groups. We have previously estimated that survival of 'mild' CRS animals will be minimally 90% while survival of 'marked' CRS animals



will be 75% minimally. While **Step 1a** is a model characterization step, we estimate that all groups on average will have a survival of at least 80%. Note that the inclusion of both male and female ZSF1 rats duplicates the number of animals required in this step.

**Total N including mortality: N = 120 female and 120 male lean ZSF1, N = 120 female and 120 male obese ZSF1**

The outcome of Step 1a will determine whether we proceed with male or female rats in Step 1b and all subsequent steps.

For **Step 1b**, we need a terminal group size of N = 5 with 4 experimental groups

Total N = 5 lean healthy ZSF1, 5 lean ZSF1 with conditions for mild CRS, 5 obese ZSF1 with conditions for mild CRS, 5 obese ZSF1 with conditions for marked CRS. We expect a maximum survival of 75% in marked CRS and a 90% survival in mild CRS. Due to the implantation of the telemetry device we expect a mortality of approximately 30% in the beginning due to inexperience. Therefore we expect a maximum survival of 60% in marked CRS and a 70% survival in mild CRS and lean ZSF1 rats.

**Total N including mortality: N = 8 healthy lean ZSF1, N = 8 lean ZSF1 with conditions for mild CRS, N = 8 obese ZSF1 with conditions for mild CRS, N = 9 obese ZSF1 with conditions for marked CRS**

For **Step 2a**, we need a terminal group size of N = 8 with 16 experimental groups to investigate whether or not **administration** of known and novel CKD-associated circulating factors may **aggravate** disease progression. As mentioned, we expect a maximum survival of 75% in marked CRS and a 90% survival in mild CRS.

With 4 (4 cohorts of 4 experimental groups, total of 16) x N = 8 per mild or marked group, we will obtain

Total N = 96 mild CRS rats, N = 32 marked CRS rats

**Total N including mortality: N = 108 mild CRS, N = 44 marked CRS**

For **Step 2b**, we need a terminal group size of N = 5 with 4 experimental groups.

Total N = 15 mild CRS, N = 5 marked CRS. As mentioned, we expect a maximum survival of 75% in marked CRS and a 90% survival in mild CRS.

**Total N including: N = 18 mild CRS, N = 7 marked CRS**

For **Step 3a**, we need a terminal group size of N = 8 with 16 experimental groups to investigate whether or not **removal** of known and novel CKD-associated circulating factors may **alleviate** disease progression. As mentioned, we expect a maximum survival of 75% in marked CRS and a 90% survival in mild CRS.

With 4 (4 cohorts of 4 experimental groups, total of 16) x N = 8 per mild or marked group, we will obtain

Total N = 32 mild CRS rats, N = 96 marked CRS rats

**Total N including mortality: N = 36 mild CRS, N = 132 marked CRS**

For **Step 3b**, we need a terminal group size of N = 5 with 4 experimental groups.

Total N = 5 mild CRS, N = 15 marked CRS. As mentioned, we expect a maximum survival of 75% in marked CRS and a 90% survival in mild CRS.

**Total N including: N = 6 mild CRS, N = 21 marked CRS**

For **Step 4a**, we need a terminal group size of N = 8 with 16 experimental groups to investigate whether or not **new drugs** of known and novel CKD-associated circulating factors may **alleviate** disease progression. As mentioned, we expect a maximum survival of 75% in marked CRS and a 90% survival in mild CRS.

With 4 (4 cohorts of 4 experimental groups, total of 16) x N = 8 per mild or marked group, we will obtain

Total N = 32 mild CRS rats, N = 96 marked CRS rats

**Total N including mortality: N = 36 mild CRS, N = 132 marked CRS**

For **Step 4b**, we need a terminal group size of N = 5 with 4 experimental groups.

Total N = 5 mild CRS, 15 marked CRS. As mentioned, we expect a maximum survival of 75% in marked CRS and a 90% survival in mild CRS.

**Total N including: N = 6 mild CRS, N = 21 marked CRS**

**Therefore, for all studies described in Appendix 1 we estimate that we will need a total maximum of:**

**N = 150 for training**

**N = 256 lean ZSF1 rats**

**N = 824 obese ZSF1 rats**

**A total of N = 1230 rats**

**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.

Unfortunately, *in vitro* data alone will not give sufficient insight into the process disease development and progression, due to the interplay of multiple organs and unknown mechanisms. Thorough searches of the literature have confirmed that experiments have not been previously conducted and our model to be developed is unique in its kind.

Replacement: Within the project, *in vitro* analyses will also be performed. Not only will we investigate cells and samples (e.g. blood) derived from the animal experiments, but patient samples will also be used. The project will have access to well-characterized HFpEF patient cohorts, enabling direct translation from bench to bedside. Immortalized cells, specifically, vascular (endothelial and smooth muscle) cells will be cultured and exposed to blood or blood constituents of defined patients and healthy controls. The rationale for performing this study *in vivo* is based on the fact that there are currently no *in vivo* models available that mimic multimorbidities that can be translated to the patient. *In vitro* experiments will take place in parallel to the animal studies. Moreover, results generated from the *in vivo* studies may subsequently be used for *in vitro* and *ex vivo* studies. Insights from these experiments may be implemented in the animal studies, creating a feedback loop.

Reduction: Before we start the experiments in which we will administer and remove known and novel circulating factors, we will first characterize and optimize our model. This will ensure that subsequent experiments can make use of a reliable model with minimized variation in our main outcome parameter E/E' (ratio between early mitral inflow velocity and early diastolic velocity of mitral annulus). This allows us to use fewer animals in our designed experiment. Statistical power analysis is subsequently used to determine the minimum number of animals per group needed to detect a change in the main outcome variable. Each animal in this study will be followed longitudinally, generating multiple results from a single animal, e.g. blood pressure, heart function and kidney function over time.

Refinement: Before we start the experiments in which we will administer and remove known and novel circulating factors, we will first characterize and optimize our model. We will be able to titrate DOCA and dietary salt to develop a 'mild' and 'severe' model of CRS in the obese ZSF1. This will ensure that subsequent experiments can make use of a reliable model with minimized variation in our main outcome parameter E/E'. Telemetry can be used to monitor pressure in the left ventricle 24/7. This realises a vast amount of reproducible data from a relatively low number of animals. Samples derived from animal experiments will be investigated and cultured and results obtained from these experiments can be implemented back into our experimental design. This longitudinal tracking will also allow us to remove animals from the study that have increased distress. We will make use of optimized protocols for working with ZSF1 animals and pain relief. This will be done in close coordination with the IvD and experts in the field.

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

All animals will be measured longitudinally [REDACTED] This allows us to monitor disease development and progression without performing experiments on a very regular basis. Model optimization and characterization will also allow us to have extensive knowledge on disease development and progression before **Step 2** and **Step 3 and 4** are initiated. **Step 1** will also allow us to titrate the DOCA pellet concentration and the dietary salt concentrations. The longitudinal measurements in **all Steps** will subsequently help us to actively take animals out of the study that shows signs of increased distress (see **Humane endpoints**).

All animals will be housed under standard conditions. Telemetry will require the animals to be placed on smart pads 24/7. However, recent developments have allowed for the manufacturing of smart pads which permits the housing of animals in pairs or trios. If possible, this will be applied. However, solitary housing is necessary during urine collection in metabolic cages. Animals will be housed solitary for a maximum of 24 hours [REDACTED]. If possible, we will use the shortest time frame for this collection.

In close coordination with the IvD and experts in the field, we will generate an optimized protocol for pain relief in these animals after intra-abdominal implanted telemeters and subcutaneous DOCA pellets.

## Repetition and duplication

### E. Repetition

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

N.A.

## Accommodation and care

### F. Accommodation and care

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

No

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

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

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

No > Continue with question H.

Yes > Describe this establishment.

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

## Classification of discomfort/humane endpoints

### H. Pain and pain relief

Will the animals experience pain during or after the procedures?

No > Continue with question I.

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

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

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

For the telemetry implantation an optimized pain relief protocol (e.g. concentrations and frequency) will be drafted after consulting literature in which telemeter implantation into the left ventricle has been performed and from previous experiences in this field at our department. General anesthesia will be induced by using a mixture of 2-4% isoflurane in oxygen and air in an induction chamber. The anesthesia will be maintained during the surgery by delivering 0.5-2% isoflurane in oxygen and air by mechanical ventilation via tracheal intubation. Analgesia with morphine analogues (buprenorphine) will be administered pre- and post-surgery as a routine procedure. Post-surgical buprenorphine will be given subcutaneously for 36 hours with an interval of 12 hours to warrant pain relief of the animals. During surgery lidocaine will be used locally before a skin incision is made and bupivacaine before closing the muscular layer.

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

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

General: Even though all surgeries occur under strict sterility, implantation of a telemeter or a subcutaneous DOCA pellet may lead to wound infection. Animals may thus develop fever or inflammation.

Specific:

Lean ZSF1 rats are healthy

Lean ZSF1 rats with DOCA+ dietary salt may develop mild CRS

Obese ZSF1 rats with or without DOCA+ dietary salt and both mild and marked CRS

Weight loss (more than 15% of body weight at the start of the protocol at 3 months of age)

Shallow breathing

Since model characterization will give us more insight into the development and progression of disease in animals with mild and marked CRS, adverse effects on welfare are currently regarded as being similar to those found in obese ZSF1 rats.

After the characterization phase, model-specific adverse effects and their influence on possible HEPs will be adjusted in consultation with the IvD.

Explain why these effects may emerge.

In general, chronic conditions such as CKD and HF can lead to weight loss.

Diastolic heart failure is specifically associated with lung edema resulting in shallow breathing. Peripheral edema occurs in humans but uncommon in rodents until they develop marked HFrEF.

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

Salt intake can be reduced. DOCA pellets can be removed. Moreover, the purpose of the first phase is to define two levels of heart failure and kidney failure: mild and relatively marked at which we can test pathogenic and therapeutic candidate substances and drugs, respectively.

### **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 development of HFrEF will be a humane endpoint, [REDACTED]. Also humane endpoints due to model-related complications are expected such as shortness of breath. Severe weight loss of more than 15% of the body weight at 3 months of age will also be seen as a humane endpoint.

Indicate the likely incidence.

Cumulatively, we expect to reach humane endpoints in 10% of the animals with mild CRS, thus 90% survival, with HEPs primarily due to technical problems related to anaesthesia required for longitudinal measurements and telemeter implantation. In animals with marked CRS we expect 25% to reach human endpoints, thus 75% survival, primarily due to the same technical problems, but also due to severe weight loss and shallow breathing.

#### **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 discomfort. Due to the inclusion that reaching HFrEF is a humane endpoint we do not expect that severe discomfort will occur [REDACTED] is already a strict point after consultation with a cardiologist. The performed procedures vary from mild to moderate. Procedures with mild discomfort include the addition of dietary salt to chow, metabolic cages, blood sampling, a one-time implantation of the subcutaneous DOCA pellet, and recovery from anesthesia and tail-cuff blood pressure measurements. The use of the latter is preferred in this project as it is non-invasive, easy to perform method and the longstanding expertise with this method at our department. Procedures with moderate discomfort include instrumentation of the animal with intra-abdominal telemetric catheters and transmitters, the possible implantation of a subcutaneous osmotic pump and the longitudinally performed measurements requiring repeated anesthesia or solitary housing in a metabolic cage.

### **End of experiment**

#### **L. Method of killing**

Will the animals be killed during or after the procedures?

No

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

Animals will be killed after the experiment since extensive work will be conducted on heart and kidney tissue, cells and samples (e.g. blood, urine). To this end we will use a variety of techniques. These include: immunohistochemistry (IHC) to define vascular, inflammatory and fibrotic changes, molecular biology to define changes in gene and protein expression, clinical chemistry to define changes in renal function. Other relevant tissues (e.g. lungs, brain, spleen, etc.) will also be collected to assess wet and dry weight, morphology and vascular, inflammatory and fibrotic changes. Isolated microvasculature will also be studied *ex vivo* in organ chamber and culture systems. Longitudinal, terminal and post-mortem measurements allow correlation between disease development and progression.

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

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

Yes

**A. Algemene gegevens over de procedure**

1. Aanvraagnummer : 2015.II.547.049
2. Titel van het project : Mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome
3. Titel van de NTS : De wisselwerking tussen nierziekte en hartziekte

## 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning  
 wijziging van vergunning met nummer :

## 5. Contactgegevens DEC

Naam DEC : DEC Utrecht  
Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247  
Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

## 6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 08-01-2016  
 aanvraag compleet:  
 in vergadering besproken: 20-01-2016 en 17-02-2016  
 anderszins behandeld: per mail: 22-02-2016  
 termijnonderbreking(en) van / tot : 22-01-2016 tot 05-02-2016  
19-02-2016 tot 22-02-2016  
 besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:  
 aanpassing aanvraag:  
 advies aan CCD: 08-03-2016

## 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: 22-01-2016
- Strekking van de vragen:

Algemeen

- De DEC complimenteert u met de inbedding van dit project in de Reconnect studie omdat de wisselwerking dierexperimenteel onderzoek en (humaan) patiënten onderzoek zo mooi naar voren komt.

#### Formulier projectaanvraag

- Vraag 1e: U hebt deze vraag niet ingevuld. Graag alsnog doen.

#### Niet Technische Samenvatting

- Algemeen: De DEC verzoekt u de NTS goed te controleren op schrijffouten en dit aan te passen.
- 3.3 Diersoort en geschatte aantallen: Het aantal dieren voor training komt niet overeen met het aantal dieren in het projectvoorstel. Graag aanpassen. Ook adviseert de DEC het aantal dieren voor training te beperken tot het aantal benodigd voor deze aanvraag.
- 3.5 Indeling dierproeven naar de verwachte ernst: U noemt hier twee categorieën; dit is echter niet terug te vinden in het projectvoorstel. Graag consistent invullen.

#### Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: Als criterium voor hartfalen wordt het dalen van de ejectiefractie genoemd, maar vervolgens wordt de voor het onderzoek belangrijke groep van patiënten met hartfalen genoemd die een normale ejectiefractie heeft. Dit zorgt voor verwarring, omdat het niet duidelijk is waarom er dan toch nog sprake is van hartfalen en waarom deze patiëntengroep in het kader van uw vraagstelling zo belangrijk is. Dit moet verduidelijkt worden. De DEC adviseert u een cardioloog mee te laten kijken met het beantwoorden van de vragen en daarmee het verbeteren van de aanvraag.
- 3.1 Achtergrond: De DEC verzoekt u de definities toe te lichten met klinische terminologie en de afkortingen wat vaker voluit te schrijven in verband met de leesbaarheid.
- 3.1 Achtergrond: De DEC verzoekt u aandacht te besteden in uw tekst aan systolisch en diastolisch hartfalen met de bijbehorende pathofysiologische kenmerken.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: 3.4.2: U gebruikt veel herhalingen. De DEC verzoekt u dit te vermijden. Tevens verzoekt de DEC u duidelijker te beschrijven wat u doet in respectievelijk stap 2 en 3.

#### Bijlage

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Bij stap 2 missen voorbeelden van circulating factors, de DEC vraagt zich af welke u precies bedoelt en aandacht te besteden aan dosering, tijd en hoeveelheid toedieningen.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC vraagt zich af of het correct is dat er in de titel van stap 3 zowel 'adding' als 'removal' staat. Graag toelichten en zo nodig aanpassen.

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC verzoekt u wat duidelijker te beschrijven waarom er zowel een mild als marked CRS-model nodig zijn voor het beantwoorden van de vraagstelling. Graag ook opnemen in de flow chart (figuur 3).
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters, pagina 2, alinea 2: [REDACTED]  
[REDACTED] De DEC verzoekt u de herhaling te verwijderen.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters, pagina 2: De DEC verzoekt u de zin 'in other words, a severe model might be ?' te verduidelijken.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters, stap 4: U noemt hier het mild model, maar de DEC heeft het idee dat u het marked model bedoelt. Zo nodig graag aanpassen.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U noemt hier humane eindpunten die u niet onder J noemt. Graag consistent invullen.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U hebt een Nederlandse zin in dit stuk opgenomen. Graag aanpassen.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Uw argument om bij stap 2a age-matched controls te gebruiken is niet valide. Graag beter beargumenteren of weglaten, omdat er altijd age-matched controles nodig zijn.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: U noemt voor de training een ander aantal dieren dan onder B en in de NTS. Graag consistent invullen. De DEC adviseert u daarbij alleen het aantal dieren te berekenen dat u nodig hebt voor dit project en goed te bedenken of een dergelijk hoog aantal nodig is. Bovendien noemt u dat er training plaatsvindt ten behoeve van een ander project, hetgeen de CCD niet zal accepteren. De CCD heeft u immers geadviseerd een apart trainingsproject te schrijven voor niet project gebonden opbouw van expertise.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC vraagt zich af of het mogelijk is om de dieren geïnstrumenteerd aan te laten leveren, om de training te kunnen schrappen. Graag uw visie.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC verzoekt u de laatste alinea te verplaatsen naar punt D, aangezien dit gaat over vervanging.
- B. De dieren: De DEC vindt uw argumentatie voor het gebruik van mannelijke ratten onvolledig; u wilt graag breed kijken, maar beperkt u dan door te kiezen voor één sekse. De DEC zou liever, in het kader van hun vraagstelling, ook een klein cohort vrouwen zien. Wellicht kunt u ervoor kiezen om bij surplus ratten enkel vrouwelijke dieren te nemen.
- B. De dieren: De DEC mist een vehikelgroep en vraagt zich af of u hier rekening mee hebt gehouden.
- D. Vervanging, vermindering en verfijning: De DEC verzoekt u beter te motiveren waarom u niet nu al een optimaal pijnstillingsprotocol opstelt.
- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: U noemt hier onder meer 'reduced exercise tolerance'. Het is de DEC echter niet duidelijk hoe u dit vaststelt. Graag toelichten.



- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: De DEC heeft het idee dat u tachypneu bedoelt in plaats van dyspneu. Graag toelichten.
- J. Humane eindpunten en K. Classificatie van ongerief: De DEC acht het in deze fase, waarin u de modellen nog moet ontwikkelen, niet realistisch is om te spreken over matig ongerief en vraagt u, in overleg met de IvD, een scoringssysteem te ontwikkelen voor de humane eindpunten. De DEC voorziet dat in de ontwikkelingsfase ook ernstig ongerief zou kunnen optreden hetgeen noodzaakt om goede humane eindpunten gedefinieerd te hebben.
- K. Classificatie van ongerief: Het is de DEC niet duidelijk of er meerdere keren DOCA pellets geplaatst moeten worden en wat dit betekent voor het ongerief. Graag toelichten.
- K. Classificatie van ongerief: De DEC vraagt zich af of u een alternatieve methode kunt gebruiken in plaats van de tail-cuff. Graag uw visie.
  
- Datum antwoord: 05-02-2016
- Strekking van de antwoorden:

#### Formulier projectaanvraag

- De bedoelde vraag kunnen we niet vinden in de documenten, naar ons weten is alles ingevuld. Welke vraag wordt er bedoeld?

#### Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: In de huidige aanvraag is er meer aandacht besteed aan het onderscheid tussen de twee typen hartfalen en is verduidelijkt waarom de patiëntengroep met hartfalen met een bewaarde ejectie fractie voor ons belangrijk is. Hieronder volgt een uitleg in het Nederlands: HF<sub>r</sub>EF, waarin de ejectie fractie daalt, wordt ook wel aangeduid als systolisch hartfalen. Een kenmerk hiervan is het minder krachtig pompen van het hart doordat de hartwand onvoldoende samentrekt om bloed uit het ventrikel te persen. Systolisch hartfalen wordt vaak gezien na een hartinfarct, waarbij een deel van de hartspier afsterft door de plotse blokkade van bloedtoevoer. Een verdunning van de hartwand treedt dan op. Aangezien de ejectie fractie gedefinieerd is als de fractie bloed dat uit de ventrikels wordt geperst per contractie, zal deze dus dalen. HF<sub>p</sub>EF, waarin de ejectie fractie bewaard is, wordt ook diastolisch hartfalen genoemd. Deze wordt vaak gekenmerkt door een abnormale diastolische functie, doordat verstijving of hypertrofie van het linker ventrikel optreedt. Door de verstijving kunnen de ventrikels niet meer goed relaxeren waardoor ze zich niet meer goed kunnen vullen met bloed. Bij fysieke inspanning wordt het hart dan functioneel verhinderd omdat het niet meer bloed kan rondpompen en symptomen van hartfalen kunnen zich dan voordoen. Juist deze HF<sub>p</sub>EF populatie is voor dit project belangrijk aangezien therapieën voor deze groep schaars zijn vergeleken met die voor HF<sub>r</sub>EF. Ook over de oorzaak en het ontstaan van HF<sub>p</sub>EF is slechts weinig bekend. Wel weten we dat het ontstaan van HF<sub>p</sub>EF samengaat met chronische nierfalen (CKD). Patiënten met een lichte vermindering van de nierfunctie, als gevolg van metabole componenten zoals diabetes, obesitas of hypertensie, lopen een veel hoger risico om HF<sub>p</sub>EF te ontwikkelen. Zo is CKD

veelvoorkomend in HFpEF, in ongeveer 26-53% van de patiënten. De combinatie van een verslechterde nierfunctie en HFpEF leidt ook tot een slechtere uitkomst en verhoogde mortaliteit in deze groep. Om deze redenen is deze patiëntenpopulatie met HFpEF en CKD voor ons interessant. Tevens is er na overleg met de cardioloog besloten om te kiezen voor de E/E' ratio als de primaire uitleesparameter in plaats van de E/A. De E/E' ratio wordt gebruikt voor het bepalen van linker ventriculaire druk tijdens het vullen van de ventrikel (Nagueh et al. Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography. J. Am. Soc. Echocardiography 2009;22:107-133). [REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Deze variabele wordt wel meegenomen in de longitudinale metingen. Deze veranderingen zijn dan ook opgenomen in de aanvraag.

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Op dit moment is het nog niet bekend naar welke circulerende factoren wij zullen gaan kijken. Het is de bedoeling dat deze factoren geleverd zullen worden vanuit de work packages 1 en 2 van het RECONNECT consortium. Vervolgens zullen wij deze verder gaan valideren in het model dat in onze aanvraag beschreven wordt. Hierbij willen we graag het belang van de wisselwerking tussen de work packages 1 en 2 benadrukken voor dit project. Het doel van het ontwikkelen van zowel het milde als het marked CRS model is puur om factoren die geïdentificeerd zijn uit de patiënt databases en in vitro analyses verder te valideren, niet om met ons model nieuwe factoren te gaan identificeren. Voorbeelden van mogelijk betrokken factoren in de progressie van CRS zijn vasoconstrictors, inflammatoire factoren, groeifactoren ([REDACTED]), matrix vormende eiwitten of uremische toxines. Het tijdstip waarin we deze factoren gaan toedienen in ons model is afhankelijk van de uitkomsten verkregen uit de karakterisatie van het model in de eerste stap. De dosering, frequentie en route van toediening hangt af van het type factor dat gevonden is. Bijvoorbeeld voor de manier van toediening, als het een eiwit betreft dan zal dit toegediend worden via een subcutane osmotische pomp terwijl in het geval van een lipofiele stof dit oraal gegeven zal worden.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het is inderdaad incorrect dat er zowel 'adding' als ook 'removal' staat. Excuus hiervoor. Dit is nu in de aanvraag aangepast zodat de stappen allemaal consistent zijn en dat duidelijk is wat er precies in welke stap gebeurt.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: In de aanvraag wordt het belang van het ontwikkelen van het milde en het marked model beter benadrukt en tevens is dit in de flow chart verwerkt. Voor dit project zijn zowel het milde als het marked CRS nodig. In stap 2 wordt het milde CRS model gebruikt om te zien of door het toedienen van de circulerende stoffen een erger fenotype veroorzaakt kan worden dat vergelijkbaar is aan de situatie van het marked CRS model. Het marked CRS model dient in deze stap dan ter controle voor het ergere fenotype. Andersom wordt in stap 3 het marked CRS model gebruikt om te zien of het inhiberen van de schadelijke circulerende factors leidt tot een milder

fenotype van de ziekte. Het milde CRS model dient dan als een referentie waarde voor het mildere fenotype.

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het aantal dieren voor de training is verlaagd en zodanig aangepast dat deze consistent is in de aanvraag. We willen graag benadrukken dat de trainingen genoemd in deze aanvraag specifiek zijn voor alleen dit project, training voor een ander project vindt niet plaats.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Het is mogelijk om de dieren geïnstrumenteerd aan te laten leveren om via telemetrie de bloeddruk te kunnen meten. Voor arteriële druk is het mogelijk om de katheter van de telemeter via de abdominale aorta, de a. carotis of de a. femoralis in te brengen. Voor het meten van de linker intraventriculaire druk, zal de katheter door het diafragma in de apex van het linker ventrikel ingebracht moeten worden. Als we dit zouden doen via de abdominale aorta, dan zouden we door het implanteren van de katheter een aortaklep insufficiëntie creëren. Vanwege de complexe operatie en om ervoor te zorgen dat de benodigde vaardigheden goed verworven worden, zal er een externe cursus voor het implanteren van de telemeter gevolgd gaan worden bij het René Remie Surgical Skills Centre in Almere (<http://www.rssc.eu/>). Deze is door Millar (waarvan we het telemetriesysteem gebruiken) aangewezen als het Europese trainingcenter voor de telemetrie implantatie. De verworven kennis tijdens deze cursus zal gedeeld worden met de andere betrokken personen in dit project en technicians van het gemeenschappelijke dierenlaboratorium (GDL) zodat we de expertise op het gebied van telemetrie implantatie voor linker intraventriculaire drukmeting min of meer permanent in huis hebben.
- B. De dieren: Bij nader inzien een valide punt. De aanvraag is zodanig aangepast dat we ook vrouwelijke ratten zullen gebruiken in Stap 1a voor karakterisatie en optimalisatie van het diermodel. Afhankelijk van de resultaten die we in deze stap zullen krijgen, zal bepaald worden met welke sekse verder gegaan zal worden. Voor de praktische haalbaarheid om de vraagstelling te kunnen beantwoorden is het belangrijk [REDACTED] [REDACTED] zowel het milde als het marked CRS verkregen moet worden.
- B. De dieren: Deze opmerking hebben we ook in onze aanvraag verwerkt, voor de groepen die geen DOCA + zout zullen ontvangen zal er een placebo pellet subcutaan geïmplantieerd worden. Op deze manier zullen alle groepen een pellet krijgen (<http://www.innovrsrch.com/product/productInfo.asp?name=PLACEBO>).
- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: Helaas is het niet mogelijk om de gereduceerde inspanningstolerantie gestandaardiseerd te meten in ons laboratorium en zijn we te voorbarig en enthousiast geweest. Hierbij willen we dan ook het gedeelte over de gereduceerde exercise tolerantie intrekken.
- I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen: Het gebruik van de term dyspneu is gewijzigd in de aanvraag om het te verduidelijken. Wat wij bedoelen is dat door de progressie van CRS de dieren oppervlakkiger kunnen gaan ademen.
- K. Classificatie van ongerief: De DOCA-pellet zal slechts één keer geplaatst worden tijdens het experiment. [REDACTED]

[REDACTED] Het ongerief zal licht zijn doordat deze pellet maar een keer subcutaan geplaatst zal worden.

- K. Classificatie van ongerief: Voor dit project is gekozen voor het meten van de bloeddruk met behulp van de tail-cuff omdat het een niet invasieve en eenvoudig uit te voeren methode is. Tevens bestaat er een jarenlange expertise op het gebied van deze techniek op onze afdeling aangezien het veelvuldig gebruikt wordt in experimenten (>40 originele publicaties). De telemetrie voor het meten van de linker intraventriculaire druk wordt toegepast in een subgroep van de dieren. Om dit te doen voor alle dieren is praktisch en financieel niet haalbaar.
  
- Datum: 19-02-2016
- Strekking van de vragen:  
Projectvoorstel
- 3.1 Achtergrond: De DEC adviseert om in de inleiding duidelijker naar voren te laten komen dat er bij systolisch hartfalen een ejectiefractiedaling is en dat bij diastolisch hartfalen dit in rust niet voorkomt, maar dat dit pas tot uitkomt bij inspanning
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Gewichtsverlies: Hier moet genoemd worden in welk tijdsbestek dit gewichtsverlies gemeten moet worden. Verder zou er door oedeemvorming ook gewichtstoename kunnen voorkomen. Hier moet ook aandacht aan besteed worden, ook in de bijlage. Invullen in overleg met de IvD.
  
- Datum antwoord: 22-02-2016
- Strekking van het antwoord:
- De opmerkingen zijn verwerkt in zowel het projectvoorstel als in de bijlage. Tevens is vraag 1 ook ingevuld op het aanvraagformulier.
  
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

#### 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 (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

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

1. 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 doelcategorieën zijn in overeenstemming met de hoofddoelstellingen.

3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. Het wordt ingeschat als een substantieel belang. Hartfalen is een wereldwijd veelvoorkomende aandoening die gepaard gaat met een hoge morbiditeit en mortaliteit. Men kan grofweg twee vormen van hartfalen onderscheiden: systolisch en diastolisch hartfalen. De mechanismen die ten grondslag liggen aan systolisch hartfalen zijn bekend en voor de behandeling van patiënten zijn verscheidene therapeutische interventies voorhanden. Dit geldt niet voor diastolisch hartfalen. Veel patiënten met diastolisch hartfalen leiden aan comorbide aandoeningen, zoals obesitas, diabetes, hypertensie en chronisch nierfalen. Dat maakt diastolisch hartfalen tot een complexe aandoening. Bovendien kan een wisselwerking tussen verschillende aandoeningen ertoe leiden dat zij elkaars verloop versnellen en de prognose van de patiënt verslechteren. Het is bekend dat een dergelijke wisselwerking optreedt bij patiënten met chronisch nierfalen en diastolisch hartfalen. Dit is het zogenaamde 'cardiorenale syndroom' (CRS). De onderliggende mechanismen zijn grotendeels onbekend en tot op heden is alleen een symptomatische behandeling van de aandoening mogelijk. Er zijn aanwijzingen dat circulerende factoren (zoals vasoconstrictors, matrixvormende eiwitten en uremische toxines) die vrijkomen bij chronisch nierfalen en diastolisch hartfalen een negatief effect hebben op de coronaire respectievelijk renale microvasculatuur, en zo het ziekteverloop versnellen. Met behulp van een nieuw rattenmodel wil de aanvrager deze aanwijzingen nader onderzoeken en de onderliggende mechanismen van het cardiorenale syndroom in kaart brengen. Dankzij de inbedding van het project in een groot consortium kunnen de verkregen inzichten op termijn mogelijk ook bijdragen aan de ontwikkeling van nieuwe therapeutische interventies en diagnostische en prognostische testen.

4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Het project is opgedeeld in vier logisch op elkaar volgende fasen. Eerst wordt het nieuwe rattenmodel gekarakteriseerd en geoptimaliseerd (stap 1). De experimenten moeten ertoe leiden dat in de dieren op betrouwbare en reproduceerbare wijze een mild of uitgesproken CRS bewerkstelligd kan worden. Met behulp van verschillende *in vivo*, *ex vivo* en *in vitro* metingen worden structurele en functionele veranderingen in het hart en de nieren in verschillende stadia van het ziekteproces in kaart gebracht. Daarna wordt de invloed van verschillende circulerende factoren op het ziekteverloop onderzocht. De keuze voor de te

onderzoeken circulerende factoren zal gebaseerd zijn op literatuuronderzoek en patiëntstudies die uitgevoerd worden in het kader van het consortium waar dit project onderdeel van is. De circulerende factoren worden toegediend aan dieren met een mild CRS (stap 2) en verwijderd/geblokkeerd bij dieren met een uitgesproken CRS (stap 3). Vervolgens wordt bekeken of dit leidt tot een meer uitgesproken (stap 2) of milder (stap 3) fenotype van het CRS. Op deze wijze kunnen circulerende factoren geïdentificeerd worden die als aangrijpingspunt kunnen dienen voor bestaande en nieuwe geneesmiddelen. Vervolgens zullen enkele van deze geneesmiddelen toegediend worden aan dieren met een uitgesproken CRS, waarna de effecten op eerdergenoemde structurele en functionele veranderingen in kaart gebracht kunnen worden (stap 4). De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen strategie/aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.

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

- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Gefokt voor dierproeven (11)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e lid 2)
- Huisvesting en verzorging
- Locatie: instelling vergunninghouder (10g)

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. Voor alle dieren in bijlage 1 wordt het ongerief ingeschat als matig. Dit ongerief is het gevolg van het herhaaldelijk bijkomen uit de anesthesie die nodig is voor training van experimentele handelingen en de longitudinale metingen van hart- en nierfunctie, van herhaaldelijke solitaire huisvesting in een metabole kooi, en (bij een deel van de dieren) van implantatie van een telemeter. De verwachting is dat voorkomen kan worden dat de dieren ten gevolge van het geïnduceerde milde/uitgesproken CRS meer dan matig ongerief ervaren, door ze intensief te monitoren en te euthanaseren zodra een van de humane eindpunten bereikt wordt. Een belangrijk aspect daarbij is het monitoren van de ejectiefractie van het linker ventrikel (voor details, zie C9). Men houdt er rekening mee dat maximaal 10% van de dieren met een mild CRS het humane eindpunt bereikt door technische complicaties die gerelateerd zijn aan de anesthesie die vereist is voor de uitvoering van de longitudinale metingen en de implantatie van de telemeters. Bij de dieren met een uitgesproken CRS houdt men rekening met een uitval van 25%. Deze uitval is het gevolg van eerdergenoemde technische complicaties en euthanasie die vereist is wanneer bepaalde modelgerelateerde complicaties (gewichtsverlies en oppervlakkige ademhaling) optreden.



7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. De (deels nog op te helderen) interacties tussen organen, weefsels en cellen die ten grondslag liggen aan het cardiorenaal syndroom zijn dusdanig complex, dat deze niet niet in hun volledigheid *in vitro* of *in silico* nagebootst kunnen worden, waardoor *in vivo* experimenten noodzakelijk zijn. De voorgestelde dierproeven worden zoveel mogelijk aangevuld met resultaten uit *in vitro* en *ex vivo* experimenten. Deze experimenten zullen worden uitgevoerd met behulp van dierlijk materiaal en materiaal afkomstig van patiënten en gezonde proefpersonen. Op deze wijze wordt reeds in een vroeg stadium van het onderzoek gewerkt aan de verificatie en translatie van resultaten uit dierexperimenten. In verband met de opzet van het onderzoek (het toedienen van circulerende factoren die het ziekteproces kunnen verergeren) en de aard van de benodigde gegevens (onder andere morfologisch onderzoek van hart en nieren) is het niet mogelijk om het onderzoek rechtstreeks in mensen uit te voeren.
  
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de vermindering van dierproeven. Het te gebruiken diermodel zal eerst uitgebreid gekarakteriseerd en geoptimaliseerd worden (stap 1), zodat de daaropvolgende experimenten (stappen 2 t/m 4) uitgevoerd kunnen worden in een betrouwbaar model met minimale variatie in de uitleesparameter. Om uitval van dieren om technische redenen zoveel mogelijk te voorkomen worden verschillende experimentele handelingen (zoals echocardiografie, imaging van de coronaire microvasculatuur, en het implanteren van een telemeter) uitvoerig geoefend voorafgaand aan de experimenten. Invasieve ingrepen worden onder terminale anesthesie uitgevoerd. Niet-invasieve ingrepen worden uitgevoerd onder lichte inhalatieanesthesie waaruit de dieren na afloop van de training bijkomen. Op deze manier kunnen dieren herhaaldelijk voor trainingsdoeleinden ingezet worden. Daarnaast wordt waar mogelijk gebruik gemaakt van surplusdieren. Voorafgaand aan de dierexperimenten zal met behulp van een poweranalyse bepaald worden hoeveel dieren nodig zijn om statistisch relevante verschillen tussen groepen te kunnen detecteren. Door de proefdieren longitudinaal te volgen en bij elk dier verschillende *in vivo*, *ex vivo* en *in vitro* metingen te verrichten worden de proefdieren zo efficiënt mogelijk ingezet. De DEC is van mening dat het maximale aantal te gebruiken dieren realistisch is ingeschat en proportioneel is ten opzichte van de gekozen strategie en looptijd.
  
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. De onderzoeksgroep heeft ervaringen met een groot deel van de te verrichten experimentele handelingen. Vaardigheid met betrekking tot het implanteren van telemeters zal verworven worden door middel van een externe cursus. Ook andere experimentele handelingen zullen voorafgaand aan de experimenten uitvoerig geoefend worden om onnodig ongerief en ongewenste variatie te voorkomen. Voor de karakterisatie en optimalisatie van het diermodel (stap 1) zullen zowel vrouwelijk als mannelijke dieren ingezet worden. Op basis van de verkregen resultaten zal bepaald worden welke sekse het meest geschikt is voor de vervolgentexperimenten (stap 2 t/m 4). De criteria met betrekking tot hart- en nierfunctie aan de hand waarvan bepaald

wordt of een mild dan wel uitgesproken CRS bewerkstelligd is zijn helder (stap 1). De ejectiefractie van het linker ventrikel in rust zal ook beoordeeld worden, omdat deze iets zegt over de vorm van hartfalen. Diastolisch hartfalen wordt namelijk gekenmerkt door behoud van de ejectiefractie in rust. Wanneer de ejectiefractie in rust onder een bepaalde drempelwaarde komt spreekt men van systolisch hartfalen. Als blijkt dat een dier systolisch hartfalen heeft ontwikkeld, dan wordt dit beschouwd als een humaan eindpunt en wordt het betreffende dier geëuthanaseerd. De interventies in de vervolggexperimenten (stap 2 t/m 4) zullen alleen uitgevoerd worden wanneer vastgesteld is dat bij de dieren de gewenste vorm van CRS is bewerkstelligd (go/no-go). Om ongerief zoveel mogelijk te beperken worden adequate en op de experimentele handelingen afgestemde analgesie- en anesthesieprotocollen toegepast. Wanneer na een chirurgische ingreep blijkt dat een dier onvoldoende herstelt, dan worden ondersteunende maatregelen getroffen (weekvoer, aanvullende analgesie en solitaire huisvesting). Mocht een dier desondanks in conditie verslechteren, dan wordt het geëuthanaseerd.

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

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

Op grond van de onder C, punt 3, genoemde overwegingen is de DEC unaniem van mening dat het belang van de doelstelling – het in kaart brengen van de onderliggende mechanismen van het cardiorenaal syndroom en het ontwikkelen van nieuwe therapeutische interventies – substantieel is. De DEC is van mening dat de juiste onderzoeksstrategie gekozen is, en dat het diermodel en de beschreven experimenten noodzakelijk zijn voor het bereiken van de doelstelling. Het vernieuwende multimorbide rattenmodel vormt een betere benadering van het cardiorenaal syndroom in mensen dan gangbare diermodellen die op één aandoening focussen. Het is niet mogelijk om dit onderzoek uit te voeren in mensen, en er zijn evenmin volwaardige *in silico* of *in vitro* alternatieven beschikbaar. Waar mogelijk worden ter ondersteuning/aanvulling van de *in vivo* experimenten ook *in vitro* en *ex vivo* experimenten uitgevoerd. De DEC is ervan overtuigd dat bij de dierproeven adequaat invulling gegeven zal worden aan de vereisten op het gebied van vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven. De proefdieren worden zo efficiënt mogelijk ingezet door bij elk dier longitudinale, terminale en post mortem metingen te verrichten, die samen een compleet beeld geven van het ziekteverloop. Het voorliggende project vormt een belangrijke schakel in een reeks experimenten die uitgevoerd worden in het kader van het consortium RECONNECT. Dit draagt in grote mate bij aan de haalbaarheid van de doelstelling de translatie van de behaalde resultaten naar de mens. Dit alles brengt de DEC tot het oordeel dat het belang van de doelstelling opweegt tegen het matige ongerief dat de dieren in dit project zullen ondervinden, en dat het gebruik van de dieren ethisch aanvaardbaar is.

#### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD



De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

### **Dierexperimentencommissie Utrecht**



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD115002016462

**Bijlagen**

2

Datum 14 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 11 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD115002016462. 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: 11500  
Naam instelling of organisatie: UMC Utrecht  
Naam portefeuillehouder of  
diens gemachtigde: ██████████  
KvK-nummer: 30244197  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
IBAN: NL27INGB0000425267  
Tenaamstelling van het  
rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?  Nieuwe aanvraag  
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn  
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 mei 2016  
Geplande einddatum: 31 december 2020  
Titel project: Mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome  
Titel niet-technische samenvatting: De wisselwerking tussen nierziekte en hartziekte  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec-utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

De leges bedragen: € 935,-  
De leges voldoet u: na ontvangst van de factuur

**Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:



Functie:



Plaats:

Utrecht

Datum:

9 maart 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU -ASC  
Postbus 80.011  
3508 TA UTRECHT  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD115002016462  
**Bijlagen**  
2

Datum 14 maart 2016  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 14 maart 2016  
Vervaldatum: 13 april 2016  
Factuurnummer: 16700462  
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

| Omschrijving   | Bedrag   |
|--|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD115002016462 | € 935,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** maandag 18 april 2016 10:06  
**Aan:** [Redacted]  
**CC:** [Redacted]  
**Onderwerp:** vraag bij AVD115002016462

Geachte [Redacted]

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend. Het betreft uw project "mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome" met aanvraagnummer AVD115002016462. Wij hebben nog 1 vraag om aanvullende informatie voor u.

U beschrijft in de bijlage dierproeven bij stap 1A dat u een vergelijking maakt tussen mannelijke en vrouwelijke ratten. Op basis van de uitkomsten van dit eerste experiment maakt u een keuze tussen mannelijke of vrouwelijke dieren voor de vervolgstappen. Onze vraag is of u bij gelijke uitkomsten en dus geen onderscheid tussen mannelijke en vrouwelijke dieren de vervolgstappen ook met beide geslachten dieren uit zou kunnen voeren,

Zou u dit willen toelichten?

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!)





Centrale Commissie Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK s-GRAVENHAGE

bezoekadres  
Bolognalaan 50  
3584 CJ Utrecht

postadres  
Postbus 12007  
3501 AA Utrecht

T (030) 253 15 69  
info@ivd-utrecht.nl  
www.ivd-utrecht.nl

uw kenmerk  
ons kenmerk

datum 20 april 2016  
onderwerp Antwoorden AVD115002016462

Mijne Dames en Heren,

Bijgaand zend ik u de antwoorden van de onderzoeker op uw brief d.d. 18 april 2016.

Het ondertekende aanvraagformulier is u per separate post toegezonden op 16 juni 2015.

Met vriendelijke groet

[Redacted signature area]

Geachte [REDACTED]

Wij bedanken de CCD voor de nauwkeurige beoordeling van ons project "mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome" (aanvraagnummer AVD115002016462) en geven graag antwoord op uw vraag om aanvullende informatie over de dierproeven in stap 1A waar wij een vergelijking willen maken tussen mannelijke en vrouwelijke ratten. Op basis van de uitkomsten van dit eerste experiment wilden wij in eerste instantie een keuze maken tussen mannelijke of vrouwelijke dieren voor de vervolgstappen.

Uw vraag is of bij gelijke uitkomsten en dus geen onderscheid tussen mannelijke en vrouwelijke dieren wij de vervolgstappen ook met beide geslachten dieren uit zou kunnen voeren. Dit is een complexe en uitdagende uitkomst waarop verschillende strategieën gevolgd kunnen worden. Om kort te gaan, wij vinden het prematuur om hierover nu al een definitieve keuze te maken. Dit zullen wij hieronder uiteraard nauwkeurig toelichten.

Eigenlijk verwachten wij al dat het model verschillend is omdat in dit rattenmodel nierfunctie verlies volgens de literatuur langzamer is bij vrouwen dan bij mannen [1]. De huidige keuze voor geslacht in Stap 2 en verder is 'slechts' gebaseerd op het feit dat er zowel een stabiel mild als marked fenotype kan worden gegenereerd binnen een aanvaardbaar tijdsbestek en dat ondanks verschillen in voortgang van nierfunctieverlies tussen de geslachten, stabiele fenotypes van hartfalen in beide geslachten te bereiken zijn.

Dit verschil in voortgang tussen de geslachten binnen het experimentele model vinden wij niet van overheersend belang voor onze mechanistische vragen.

[REDACTED]

[REDACTED] en uw vraag wijst ons weer op de noodzaak om dit nu te gaan doen!

[REDACTED]

[REDACTED] Mochten de mannen 'te snel' afglijden naar HFREF, dan is dat een argument om met vrouwen door te gaan: anders dreigt te vaak een humaan eindpunt in Stap 2 (toevoegen circulating factors). Mocht de afname in hartfunctie in vrouwen te lang duren, of gelijke afname bereikt worden met een veel zwaarder protocol dan in mannen, dan is dat een argument om met mannen door te gaan.

Een andere mogelijkheid is om na Stap 1 verder te gaan met gemengde groepen (met een gelijk aantal mannen en vrouwen).

[REDACTED]

[REDACTED] Dit gaat onze logistiek en financiën ver te boven. Daarom verkiezen wij de optie om een rationele keuze "en route" te maken volgens voornoemd plan.

Kortom, wij willen beide opties open houden en onze mogelijkheden zeker nu nog niet gaan beperken. Uiteraard zullen wij alles Stap voor Stap met de IvD overleggen. Mocht het nodig zijn dan komen wij terug bij de CCD met een wijziging waarbij wij uitbreiding van het aantal dieren aanvragen.

Vriendelijke groet,

[REDACTED]

1. Babelova et al. Sex-differences in renal expression of selected transporters and transcription factors in lean and obese Zucker spontaneously hypertensive fatty rats. *J Diabetes Res.* 2015: 483238

**From:** [Info-zbo](mailto:info-zbo)  
**To:** [REDACTED]  
**Cc:** [Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht](http://www.centralecommissiedierproeven.nl)  
**Subject:** vraag bij AVD115002016462  
**Date:** maandag 18 april 2016 10:07:35

---

Geachte [REDACTED],

U heeft bij de CCD een aanvraag tot projectvergunning ingediend. Het betreft uw project "mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome" met aanvraagnummer AVD115002016462. Wij hebben nog 1 vraag om aanvullende informatie voor u. U beschrijft in de bijlage dierproeven bij stap 1A dat u een vergelijking maakt tussen mannelijke en vrouwelijke ratten. Op basis van de uitkomsten van dit eerste experiment maakt u een keuze tussen mannelijke of vrouwelijke dieren voor de vervolgstappen. Onze vraag is of u bij gelijke uitkomsten en dus geen onderscheid tussen mannelijke en vrouwelijke dieren de vervolgstappen ook met beide geslachten dieren uit zou kunnen voeren,

Zou u dit willen toelichten?

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!)

**Centrale Commissie Dierproeven**

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UMC Utrecht

Postbus 12007  
3501 AA UTRECHT

**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  
AVD115002016462

**Uw referentie**

**Bijlagen**

1

Datum 26 april 2016  
Betreft Beslissing Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 11 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome" met aanvraagnummer AVD115002016462. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 20 april 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld na vragen van de CCD. Uw antwoord volstaat: u maakt de keuze voor het inzetten van een of beide geslachten na fase 1 in uw project in overleg met de IvD. In geval u het aantal dieren op uw vergunning wilt uitbreiden door het inzetten van beide geslachten in het vervolg van uw project na fase 1 dan doet u dit middels een wijzigingsaanvraag.

De CCD spreekt haar waardering uit over de wijze waarop u in vitro en in vivo onderzoek parallel uitvoert binnen uw project en de manier waarop u de mogelijkheden tot 3V toepassingen heeft beschreven.

**Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de dierproeven (hierna: de wet). De algemene voorwaarden 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 "Mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 mei 2016 tot en met 31 december 2020 hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

**Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 8 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Aangevuld met twee algemene voorwaarden.  
Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

### **Bezwaar**

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

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

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

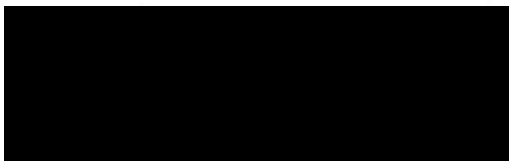
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

De Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma  
plv 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: UMC Utrecht  
Adres: Postbus 12007  
Postcode en woonplaats: 3501 AA Utrecht  
Deelnemersnummer: 11500

deze projectvergunning voor het tijdvak 1 mei 2016 tot en met 31 december 2020, voor het project "Mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome" met aanvraagnummer AVD115002016462, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is [REDACTED] Voor de uitvoering van het project is Promovendus verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

1. een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 11 maart 2016
2. de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a. Projectvoorstel, zoals ontvangen bij digitale indiening op 11 maart 2016;
  - b. Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen bij digitale indiening op 11 maart 2016;
  - c. Advies van Dierexperimentencommissie dd 8 maart 2016, ontvangen op 11 maart 2016;
  - d. De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 20 April 2016.

### Dierproeven

| Naam dierproef  | Diersoort                  | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen   |
|---|----------------------------|---------------|-------|---|
| Cardiac and renal function and structure in the obese ZSF-1 rat | Ratten (Rattus norvegicus) | 1230          | Matig | In totaal worden 1230 dieren ingezet. Dit zijn n=150 voor training, n=256 Lean ZSF1 ratten, n=824 obese ZSF1 ratten |

### Voorwaarden

Op grond van artikel 10a1 lid 2 van de Wet zijn aan een projectvergunning voorwaarden te stellen. De vergunning wordt verleend onder de voorwaarde dat eventuele go/no go momenten worden afgestemd met de IvD.

In artikel 10, lid 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**

26 april 2016

**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD115002016462

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:** dinsdag 10 mei 2016 9:18  
**Aan:** 'dec-utrecht@umcutrecht.nl'  
**Onderwerp:** teugkoppeling besluit AVD115002016462

Geachte leden van DEC Utrecht,

Bij de CCD is een aanvraag tot projectvergunning ingediend waar uw DEC advies over heeft uitgebracht. Het betreft het project "Mechanisms and new therapies in cardiorenal syndrome" met aanvraag nummer AVD115002016462, uw interne code 2015.II.547.049.

Op basis van uw advies heeft de CCD besloten de aanvraag te vergunnen, aan de vergunning zijn twee algemene voorwaarden verbonden om te voldoen aan datgene wat voortkomt uit artikel 10a van de wet. De aanvrager is van het besluit op de hoogte gesteld.

De CCD dankt u voor het uitbrengen van uw advies,

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 W16-16S |                                    |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
|--------------------------------|------------------------------------|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
|                                |                                    | wordt verstrekt |      |        |       | weigeringsgronden |        |        |      |
| nr.                            | document                           | reeds openbaar  | niet | geheel | deels | 10.1.c            | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
|                                | <b>NTS2016464</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                              | Advies CCD                         |                 | x    |        |       |                   |        |        | x    |
| 10                             | Beschikking en vergunning          |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 11                             | Mail terugkoppeling DEC 26-4-2016  |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |

29 MAART 2016



Centrale Commissie Dierproeven

ARD 105002016464

## 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?<br><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.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | Straat en huisnummer   | A. Deusinglaan 1 [REDACTED]  |
|     |   | Postbus  |  |
|     |   | Postcode en plaats   | 9713 AV GRONINGEN  |
|     |   | IBAN   | NL45ABNA0474567206   |
|     |   | Tenaamstelling van het rekeningnummer                              | Rijksuniversiteit Groningen  |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.  | (Titel) Naam en voorletters  | [REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
|     |   | Functie  | [REDACTED]   |
|     |   | Afdeling   | [REDACTED]   |
|     |   | Telefoonnummer   | [REDACTED]   |
|     |   | E-mailadres  | [REDACTED]   |
| 1.5 | <i>(Optioneel)</i> Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.  | (Titel) Naam en voorletters  | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.                       |
|     |   | Functie  |  |
|     |   | Afdeling   |  |
|     |   | Telefoonnummer   |  |
|     |   | E-mailadres  |  |

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |               |
|------------|---------------|
| Startdatum | 28 - 4 - 2016 |
| Einddatum  | 28 - 4 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- |   |
|---|
| Alternative mechanisms of visual adaptation: evolutionary causes and consequences in cichlid fish |
|---|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- |   |
|---|
| De rol van visuele aanpassing bij het ontstaan van nieuwe soorten |
|---|
- 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 € 1441 Lege
- Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.
- Via een eenmalige incasso
- Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
Dierproeven  
Postbus 20401  
2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehulst 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 24-03-2016

Handtekening 



## Format Projectvoorstel dierproeven

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

Background and scientific importance:

Organisms can deal with environmental variation in two ways: evolutionary adaptation and phenotypic plasticity. Evolutionary adaptation proceeds by Darwinian selection favouring certain genotypes over others, changing the genetic composition of populations over subsequent generations. Phenotypic plasticity confers the ability to develop different phenotypes without the need for genetic change, allowing much faster phenotypic changes depending on the environment. In this project, we study the relative importance of these two mechanisms for species diversification and coexistence.

Phenotypic plasticity facilitates the colonisation of new niches, exposing populations to novel selection pressures that may initiate genetic divergence and eventually speciation. However, plasticity can also inhibit species divergence and coexistence, because it weakens selection for genetic differentiation. Also, a non-genetic basis of population differences may increase the vulnerability to environmental change. Consequently, plasticity has been suggested to promote as well as inhibit speciation.

Here, we propose to address this problem by directly comparing the effects of genetic and plastic changes to species persistence, diversification and coexistence. As a model system, we use the cichlid fish family which is famous for both phenotypic plasticity and rapid speciation. We focus on the visual system as our trait of interest, because visual adaptation is a major component of species divergence in aquatic environments ( [REDACTED] ), and visual systems are shaped by genetic factors as well as subject to environmental plasticity ( [REDACTED] ).

#### 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?

Research question: How do different mechanisms of visual adaptation contribute to species divergence, persistence and coexistence in African cichlid fish?

Feasibility: this is a 5-year project involving several people (PhD students, postdoctoral staff, animal caretakers, molecular lab technician). All techniques are already being employed in our current research. We also have an extensive aquarium facility in which we are successfully keeping, breeding and studying cichlid fish. [REDACTED]



### 3.3 Belang

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

Scientific importance: the relative importance of genetic and plastic mechanisms of adaptation for species formation and persistence are unknown. Progress requires integration of new techniques in (phylo)genetics with quantitative assessment of individual behaviour and fitness of animals in semi-natural contexts. Societal importance: Our limited understanding of the relationship between plasticity and biodiversity challenges our ability to predict how species respond to environmental change. The current scale of human-induced changes, i.e. global warming and habitat loss, make it even more urgent for biologists to understand this relationship.

Specifically, the cichlid fish of Lake Victoria have experienced major human-induced environmental changes due to eutrophication, the introduction of an invasive predator (Nile Perch), and overfishing. Many cichlid species have disappeared but some appear to adapt and persist. Species differences in the extent of plasticity may explain some of this variation: highly plastic species may have coped better than less plastic species. Visual performance is a major determinant of cichlid biology: they use visual cues to detect food, predators and mating partners. Because eutrophication dramatically changes under-water light conditions, the maintenance of visual performance is important for individual survival and mating behaviour - and thereby the risk of inter-specific hybridisation and species collapse. The role of visual plasticity in all of these processes is completely unknown. Here, we will test how visual plasticity contributes to individual survival and behaviour in a changing light environment. This will enable us to better predict how vulnerable species are to changes in underwater light conditions, which is important for developing adequate conservation measures.

In addition, our results may be used to improve aquaculture practices. Tilapia, also a cichlid species, is one of the most important food fish of the world (FAO 2005-2013 *Cultured Aquatic Species Information Programme*). Light conditions are known to affect its growth, survival and wellbeing, but current research effort is scarce and scattered (e.g. Volpato & Barreto 2001 *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*; Elnwshy et al 2012 *International Journal of Agriculture and Biology*). Our study could be the start of a more systematic approach, that benefits both fish welfare and aquaculture profitability.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

We focus on the African cichlids, taking advantage of well-documented species distributions, ecological niche characterisations and phylogenetic relationships (Wagner et al 2014 *Ecology Letters*). The project contains 4 parts: characterising 1) species-specific visual plasticity and 2) visual genotype, and testing the effects on 3) individual behaviour and 4) population persistence.

Part 1: Characterisation of visual plasticity

We will collect two measures of visual plasticity:

- a) Literature survey: for all species in the phylogeny (~650), we will determine their visual niche and categorize them as visual niche specialist or generalist. These data are available for nearly all cichlid species in the world, given that they are extensively studied by scientists as well as kept as pets (see e.g. Seehausen 1996 *Lake Victoria Rock Cichlids*; Deutsch 1997 *Biological Journal of the Linnean Society*; Konings 2015 *Tanganyika Cichlids in their Natural Habitat*).
- b) Experimental quantification: for a subset of species, we will measure visual pigment expression in fish raised under two different light conditions.

Part 2: Visual pigment genotyping

Since the effect of plasticity in pigment expression on visual performance depends on the visual pigment genes carried by an individual, we need to take

pigment genotype into account when selecting species for the experiments. For many species, these data are already available. If necessary, we will conduct additional sequencing for specific species of interest.

#### Part 3: Effects of visual adaptation on behaviour

The ecological and evolutionary consequences of visual adaptation operate through effects on individual behaviour. Therefore, for a subset of species, we will quantify the effects of visual genotype and visual plasticity on three visual behaviours that are important for species persistence: foraging performance, habitat choice and mate selection.

#### Part 4: Effects of visual adaptation on population persistence

We will study the population-level consequences of visual adaptation in mesocosms (experimental systems under semi-natural, controlled conditions), in which we monitor the growth, survival and spatial segregation of groups of juveniles of both high-plasticity and low-plasticity species and of different visual pigment genotypes.

---

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

---

#### Part 1: Characterisation of visual plasticity

a) The literature survey does not require animal experiments.

b) Experimental quantification: for 18 species, we will quantify plasticity by rearing fish under two different visual conditions: broad-spectrum (B; representing shallow or clear waters) and yellow-shifted narrow spectrum (N; representing deeper, turbid waters), until they are sacrificed for measuring visual pigment expression. The difference between conditions provides a quantitative measure of visual plasticity. [REDACTED]

[REDACTED] and follows established procedures (e.g. Carleton 2011 in *Molecular Methods for Evolutionary Genetics*). The experiment is described in detail in appendix 1: quantifying plasticity.

#### Part 2: Visual pigment genotyping

For many species, visual pigment genes have already been sequenced. If necessary, we will conduct additional sequencing for specific species of interest. This entails cutting a small piece of fin (1 mm<sup>2</sup>) for DNA extraction and subsequent sequencing of nucleotide positions that are known to affect pigment absorption properties [REDACTED]

#### Part 3: Effects of visual plasticity on behaviour

We will select four species with high plasticity (based on Part 1) and breed additional families under the two light different light conditions (B and N). We will then conduct, under the same two light conditions, three different behavioural experiments.

a) habitat choice: we will present the fish with a choice between B and N light conditions.

b) foraging performance: we will quantify the feeding efficiency on live prey under both light conditions.

c) female mate choice: taking advantage of the colour variation in the cichlid family, we will present females with differently coloured males of closely related species, with the colour difference corresponding to the direction of the shift in visual sensitivity.

All fish will be PIT-tagged (Passive Integrated Transponder) for individual identification. In addition, fish will be finclipped for DNA sampling to confirm visual

---

pigment genotype (there may be genetic variation within species and we need to be sure of the pigment genotype of all individuals tested).

The experiments are described in detail in appendix 2: behavioural trials.

#### Part 4: Effects of visual adaptation on population persistence

We will select 3 species pairs with similar visual pigment genotypes, each consisting of a species with high plasticity and a species with low plasticity. We raise them under both B and N conditions for ~4 months. We then introduce groups of fish, from different species/rearing light combinations, into mesocosm ponds. Ponds will be illuminated with either B or N, or a combination of the two light treatments (BN). We will monitor growth and survival for 3 months by catching and measuring all fish every 2 weeks. Before and after the experiment, DNA will be collected. This serves two purposes: first, to confirm visual pigment genotype (if species are polymorphic, i.e. harbour multiple pigment genotypes) and second to identify individuals (to determine which individuals have died). After the experiment, fish will be sacrificed for visual pigment expression analysis. In addition, BN ponds will be equipped with antennas to register fish spatial position; for this purpose all fish in BN ponds will be PIT-tagged.

The experiment is described in detail in appendix 3: mesocosm experiment.

#### 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.

The first step in the project is to categorize and quantify visual plasticity (Part 1). For both measures of plasticity, we will then conduct a phylogenetic analysis to test 1) whether visual plasticity facilitates the invasion of novel niches, as evidenced by higher plasticity in younger species; 2) whether the invasion of novel niches initiates species divergence, as evidenced by higher plasticity in species-rich lineages compared to species-poor lineages; and 3) whether plasticity in pigment expression predicts visual niche specialisation; in other words: does plasticity indeed confer the ability to exploit a broader range of environments?

Visual pigment genotyping (Part 2) will run in parallel. Genotype information will be used to select the species for quantifying plasticity. In addition, pigment genotyping will allow us to address:

- 1) The contribution of visual pigment sequence evolution to diversification: are certain pigment sequences associated with elevated speciation rates (indicating that pigment evolution enables visual niche expansion, that promotes subsequent divergence in other traits); and/or do speciation events coincide with pigment sequence changes (indicating that divergent sensory adaptation can drive speciation, as has been suggested for some cichlid taxa).
- 2) The evolutionary relationship between visual pigment sequence and visual plasticity: plasticity could diminish the 'need' for sequence changes, generating a negative relationship between pigment sequence diversity and plasticity across lineages, but may also amplify the effects of sequence changes, thereby accelerating divergent adaptation and generating a positive relationship. We will also test whether certain pigment genotypes are associated with higher levels of plasticity than others – which seems likely because the functional consequences of plasticity depend on the pigment genotype.

The data emerging from Parts 1 and 2 will determine what species will be used in Parts 3 and 4.

The experiments of Part 3 will quantify the effect of genetic and plastic variation in colour vision properties on foraging performance, visual habitat choice and mate choice. We use only high-plasticity species here and do not consider low-plasticity species. This is because we are interested in the consequences of a plastic response, and thus we measure the differences between individuals raised in alternative environments. Species not showing a plastic response would not provide useful information.

Part 3 will allow us to make an initial assessment of the potential of sensory plasticity to influence species persistence and divergence. The next step is to assess the fitness consequences of this variation in a more natural setting, in which individuals must cope with a novel visual environment and compete with another species. Thus, in Part 4, we test the prediction that in novel visual environments, high-plasticity species outcompete low-plasticity species. In BN ponds, we test the prediction that plasticity influences niche segregation and community dynamics: in species with high plasticity, individuals from different rearing environments will segregate between the two visual zones, while low-plasticity species will not show such segregation. We also test whether growth and survival will be higher for high-plasticity species. We select 3 species pairs (based on Parts 1+2) that have similar visual genotypes but differ in plasticity.

In both Parts 3 and 4, we run the experiments on all experimental species in parallel. This is necessary because the outcomes will be influenced not only by visual genotype and plasticity, but by other traits as well. To control for these influences we need replicates of species with similar visual characteristics. Experiments on replicate species must be run at the same time to ensure that conditions are the same for all species.

. The design and scope of the experiments proposed here are based on this ongoing work.

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

| Volgnummer | Type dierproef         |
|------------|------------------------|
| 1          | quantifying plasticity |
| 2          | behavioural trials     |
| 3          | mesocosm experiment    |
| 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.           | 10500                       |                        |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Rijksuniversiteit Groningen |                        |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | Volgnummer                  | Type dierproef         |
|     |  | 1                           | quantifying plasticity |

*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.

Plasticity in visual development has been established in a few fish species, including cichlids (e.g. Fuller et al 2005 *J. Evolutionary Biology*; Shand et al 2008 *J. Experimental Biology*; Hofmann et al 2010 *Molecular Ecology*). However, previous studies have used artificial light conditions and thus do not allow realistic estimation of the extent of plasticity that would occur in nature. Moreover, between-species comparison requires standardised experimental procedures.

What is needed to understand the role of visual plasticity in cichlid evolution is a systematic analysis in a relatively large number of species, and using realistic visual conditions.

We select 18 species, representing both species-rich and species-poor lineages and different visual niches (broad-spectrum specialists; narrow-spectrum specialists; generalists).

We use light conditions that represent the two most distinct visual environments that cichlids experience in nature

██████████ broad spectrum (B) and yellow-shifted narrow spectrum (N). ██████████

██████████ and follows established procedures (e.g. Carleton 2011 in *Molecular Methods for Evolutionary Genetics*).

Fish will be reared under these conditions until they are sacrificed for measuring visual pigment expression. The difference between conditions provides a quantitative measure of visual plasticity.

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.

Fish are bred by housing individual males with groups of females. When eggs are about to hatch (about 5

days), they are divided between B and N light conditions. They are kept there for 6 months (~sexual maturity). Every month, we randomly select 10 individuals from each species, 5 from each light condition, to be sacrificed (see below) for the analysis of visual pigment expression. The period of 6 months is chosen because the sensitive period for environment-induced effects on visual development is unknown, and therefore we expose the fish during the entire developmental period - but not longer than this because effects are less likely after reaching sexual maturity (Carleton et al 2008 *BMC Biology*). Sacrificing fish every month, rather than sacrificing all fish at the end, allows us to determine the developmental trajectory and thus maximises the information gained without increasing the number of individuals.

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

Number of species: Based on previous and ongoing studies, we expect substantial differences between species from different visual niches and different evolutionary histories. Thus, for each of our experimental categories (n=6 different combinations of visual niche and evolutionary history, see below) we include 3 species.

Number of individuals: previous studies have found plasticity effects ranging from zero to 14-fold increase or decrease in pigment expression (e.g. Hofmann et al 2010 *Molecular Ecology*; Smith et al 2012 *Genes Brain and Behaviour*). However, these studies used only 10 individuals per species, obtained from only one or two breeding families, i.e. mostly full-siblings. Developmental studies of opsin expression used 2-3 individuals per sampling point, and found large individual variation, even within families (O'Quin et al 2011 *Evolution and Development*). To make sure that our results are representative, we will use 5 individuals per sampling point, originating from at least 3 families per species. Thus, the number of families follows from 1) the number of required individuals; and 2) the consideration that genetically independent individuals generate results that are more representative for the species as a whole.

Regarding the statistical procedures, data will be analysed using Generalized Linear Mixed Models. This approach allows us to analyse all experimental factors (treatment, time point, species) in a single model, to control for family effects, and to aggregate the dataset at different levels (e.g. combining species, families, time points and treatments in order to estimate the effects of single variables).

## **B. De dieren**

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

Species: Cichlid fish are chosen for this research because they inhabit different visual environments in nature and exhibit visual plasticity. The family has species-rich as well as species-poor lineages, providing a natural laboratory for testing evolutionary hypotheses. We focus on the African cichlids, because their species distributions, ecological niches and phylogenetic relationships are well-documented. We also choose cichlids because they do very well in the laboratory environment. They adjust rapidly to aquarium conditions, show natural behaviour and reproduce frequently. Species selection will be done based on phylogenetic analysis of visual niches.

Origin: We will work with F1 offspring of wildcaught fish. African cichlids are popular in the aquarium hobby and many species can be obtained from commercial exporters. For species that are difficult to obtain commercially, we will ask the assistance of the cichlid research community.

Numbers:

1) Number of species: we select 18 species for the experiments. We need to test species of each of the three visual niche categories (broad-spectrum specialists; narrow-spectrum specialists; generalists), representing both species-rich and species-poor lineages. Because 'lineage' is our unit of comparison when testing phylogenetic effects, we sample species-rich and species-poor lineages equally, with one species per lineage. This yields 6 different combinations. We use 3 replicates for each combination, yielding a total of 18 species.

2) Number of individuals: In order to achieve a robust estimate of pigment expression for each species, we estimate that we will need 5 individuals from each light treatment at each time point (O'Quin et al 2011 *Evolution and Development*). This yields a total number of 1080 fish (18 species \* 2 light treatments \* 6 sampling times \* 5 individuals). Clutch sizes in African cichlids range from 20 to 120. For most species, 3 families will therefore be enough to produce the required sample size (60 per species); for species with small clutch sizes we will breed one or two additional families as needed.

---

**C. Hergebruik**

---

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

---

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

Nee

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

---

**D. Vervanging, vermindering en verfijning**

---

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

Replacement: Not applicable; we are interested in the fish themselves and therefore need to study the live organism.

Reduction: even though it is easy to obtain many more families once the fish are breeding, we choose to collect only 3 families per species if this is enough to produce the required sample size; additional families will be bred only if needed.

Refinement: the experimental light conditions are within the natural range experienced by cichlid fish. Water quality and temperature will be continuously monitored. Fish will be fed with a diverse range of commercial pellets and flakes, frozen invertebrates and algae, and occasionally live food. Aquaria will have gravel substrate (several species tend to dig during foraging and territory settlement) and pvc tubes for shelter.

---

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.

In addition to the above, fish will be housed in groups which corresponds to the natural situation. If too much aggression is observed (see below), fish will be either housed individually, separated by transparent, perforated partitions to allow social behaviour, or group density will be increased by combining families of different species in the same tank. Low density is a well-known risk factor for aggression in cichlids. Experiments will not have detrimental effects on the environment.

---

## 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.

We are very well connected to the cichlid research community and collaborate with the experts on the cichlid visual system. Comparison of visual development between alternative natural visual environments has not been done, not in cichlids and not in any other fish species.

---

## Huisvesting en verzorging

**F. Huisvesting en verzorging**

---

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

Nee

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

---



### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Group housing may entail aggressive interactions, especially at low density.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

To a large extent, this is natural behaviour. However, in the confinement of an aquarium, the opportunities for subordinate individuals to escape are limited.

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

Fish welfare is monitored daily. Group densities will be kept sufficiently high (i.e. at least 6 fish per group). Also, tanks will contain shelters. If aggression leads to injury or weight loss, we will intervene (as explained above).

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

### K. Classificatie van ongerief

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

licht

## 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.

Visual pigment expression can only be measured by taking the retina out of the fish.

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.           | 10500                       |                    |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Rijksuniversiteit Groningen |                    |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | Volgnummer                  | Type dierproef     |
|     |  | 2                           | behavioural trials |

*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.

Patterns of plasticity may tell us something about the mechanistic basis of traits, and are necessary for understanding how traits evolve. But to assess how plasticity affects speciation, we need to identify its consequences of for individual behaviour. This step is often missing in current studies of sensory variation, even though some changes are much more consequential than others, and may be environment-dependent. Therefore, we will select four species with high visual plasticity and explore the effects of visual plasticity on three specific behaviours that directly influence species divergence and persistence:

a) habitat choice: organisms use environmental cues to move towards favourable habitats. This phenomenon, despite its obvious evolutionary consequences, has long been ignored in the ecological and evolutionary literature but has recently regained attention (Edelaar & Bolnick 2012 *Trends in Ecology & Evolution*). Habitat choice contributes to the persistence of phenotypes that would otherwise be outcompeted and thereby contributes to the maintenance of biological diversity. Moreover, it effectively sorts phenotypes over habitats, which increases the extent of assortative mating between similar phenotypes. Through both these effects, habitat choice can play an important role in speciation. Sensory abilities are important determinants of habitat choice, as they influence an individual's perception of the environment and its performance.

a) foraging performance: sensory abilities determine the efficiency of food detection and capture. This implies that successful establishment in a new niche requires changes in sensory abilities, either plastic or genetic, which subsequently allow the exploitation of novel resources, contributing to survival. As a result, changes in sensory abilities may precede the evolution of specialised adaptations, such as feeding morphology.

b) female mate choice: in many animals, reproductive isolation between closely related species depends on

species-specific mate preferences for species-specific signals. This implies that changes in sensory abilities, by affecting the perception of these signals, could immediately affect patterns of assortative mating. In cichlid fish, male coloration is a major determinant of female mate preferences and changes in female colour perception directly affect the extent of species-assortative mating [REDACTED]

Outcome parameters: we will quantify the extent to which plastic changes in colour vision affect these three behaviours. Thus, after behavioural data collection all fish will be sacrificed for quantification of visual pigment expression.

---

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.

We will select four species with substantial plasticity (based on Part 1) and breed additional families under the two different light conditions (B and N). Once the fish have reached adulthood (~7-9 months), we will conduct, under the same two light conditions, the three behavioural experiments.

a) habitat choice

In a large tank (150\*50\*50 cm), we implement B and N light conditions, separated by an opaque partition with one large hole for the fish to swim through. Fish are introduced in small groups (4 individuals; these groups are the unit of analysis) and we record the time they spend on either side for a period of 1-2 hours. All groups will be tested 4 times, with alternating combinations of trial conditions (introduction side left or right; B condition implemented left or right). There will be at least one day in-between subsequent trials. Procedures are based on previous studies on fish habitat choice (Meager & Utne-Palm 2008 *Environmental Biology of Fish*; Rick & Bakker 2010 *Evolutionary Ecology*) as well as ongoing experiments in our own lab.

b) foraging performance

Fish are individually housed but with visual contact with at least one neighbour. We introduce a known number of live invertebrate prey (e.g. Daphnia, mosquito larvae or shrimp) and quantify prey capture for a period of 20 minutes. Fish are tested twice in each light condition, with light conditions changing the next day. Including a period of acclimation, fish will spend not more than 5 days in the setup. Procedures are based on previous experiments on fish foraging behaviour (Meager & Utne-Palm 2008 *Environmental Biology of Fish*; Rick & Bakker 2010 *Evolutionary Ecology*), [REDACTED]

c) female mate choice

In a large tank (150\*50\*50 cm), females are presented with two differently coloured males, behind transparent and perforated partitions. For 1 hour, we record all courtship behaviours of the males and the response of the female, [REDACTED]

Females are tested twice under both light conditions.

All fish will be PIT-tagged (Passive Integrated Transponder) for individual identification; they will be sacrificed after the experiments for analysis of visual pigment expression.

---

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

Determination of sample sizes (species, individuals) is based on the following considerations:

- 1) minimising the number of animals;
- 2) producing robust estimates of behavioural differences;
- 3) logistical restrictions: the time and space available to breed the animals and conduct the experiments.

The estimated number of individuals is the result of power analyses, using the results of previous and ongoing studies on cichlid visual behaviour ([REDACTED])

The number of families we use per species (3-5) is the result of two considerations: 1) the number of required individuals; and 2) the consideration that genetically independent individuals generate results that are more representative for the species as a whole.

Regarding the statistical procedures, data will be analysed using Generalized Linear Mixed Models. This

approach allows us to analyse all experimental factors (treatment, species) in a single model, to control for family effects, and to aggregate the dataset at different levels (e.g. combining species, families and treatments in order to estimate the effects of single variables).

## B. De dieren

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

Species: Cichlid fish are chosen for this research because they inhabit different visual environments in nature and exhibit visual plasticity. The family has species-rich as well as species-poor lineages, providing a natural laboratory for testing evolutionary hypotheses. We focus on the African cichlids, because their species distributions, ecological niches and phylogenetic relationships are well-documented. We also choose cichlids because they do very well in the laboratory environment. They adjust rapidly to aquarium conditions, show natural behaviour and reproduce frequently. Species selection will be done based on phylogenetic analysis of visual niches.

Origin: We will work with F1 offspring of wildcaught fish. African cichlids are popular in the aquarium hobby and many species can be obtained from commercial exporters. For species that are difficult to obtain commercially, we will ask the assistance of the cichlid research community.

Numbers: for each species, we will use adult fish from 3 to 5 families (as in Part 1). These will be raised under experimental light conditions (see Part 1). To use the families efficiently we use both males and females, as follows: habitat choice experiments are done in groups including both sexes; given that males and females inhabit the same environment in nature we do not expect differences between them. Males will be used for foraging experiments; females will be used for mate choice experiments. For each experiment, we aim for  $n=15$  for each light treatment:

habitat choice: 4 species x 15 groups x 4 fish per group x 2 treatments = 480 fish;

foraging: 4 species x 15 males x 2 treatments = 120 fish;

mate choice: 4 species x 15 females x 2 treatments = 120 fish;

Total  $n= 720$  fish.

## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

## D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Replacement: Not applicable; we are interested in the fish themselves and therefore need to study the live organism.

Reduction: even though it is easy to obtain many more families once the fish are breeding, we choose to collect only 3-5 families per species to achieve the necessary number of individuals while maintaining a reasonable level of genetic diversity. The number of 720 individuals is a direct consequence of our aim to draw general conclusions, which requires adequate group sizes for multiple species/treatment combinations.

Refinement: the experimental light conditions are within the natural range experienced by cichlid fish. Water quality and temperature will be continuously monitored. Fish will be fed with a diverse range of commercial pellets and flakes, frozen invertebrates and algae, and occasionally live food. Aquaria will have gravel substrate (several species tend to dig during foraging and territory settlement) and pvc tubes for shelter.

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.

In addition to the above, fish will be housed in groups which corresponds to the natural situation. If too much aggression is observed (see below), fish will be either housed individually, separated by transparent, perforated partitions to allow social behaviour, or group density will be increased by combining families of different species in the same tank. Low density is a well-known risk factor for aggression in cichlids. Experiments will not have detrimental effects on the environment.

## 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.

We are very well connected to the cichlid research community and collaborate with the experts on the cichlid visual system. The behavioural consequences of visual plasticity have been addressed in only one study (Smith et al. 2012 *Genes Brain Behaviour*)- and this study looked at a context-independent behavioural measure of visual sensitivity (optomotor response). The effects of plasticity in the more natural contexts we use here have not been investigated.

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Ja > Geef dan aan welke pijnverlichtingsmethoden worden toegepast en op welke

wijze wordt verzekerd dat dit op een optimale wijze gebeurt.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Group housing may entail aggressive interactions, especially at low density.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

To a large extent, this is natural behaviour. However, in the confinement of an aquarium, the opportunities for subordinate individuals to escape are limited.

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

Fish welfare is monitored daily. Group densities will be kept sufficiently high (i.e. at least 6 fish per group). Also, tanks will contain shelters. If aggression leads to injury or weight loss, we will intervene (as explained above).

### J. Humane eindpunten

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

Nee > Ga verder met vraag K.

Ja > Geef aan welke criteria hierbij worden gehanteerd.

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

### K. Classificatie van ongerief

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

licht

## 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.

Visual pigment expression can only be measured by taking the retina out of the fish.

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.           | 10500                       |                      |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Rijksuniversiteit Groningen |                      |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | Volgnummer                  | Type dierproef       |
|     |  | 3                           | mesocosm experiments |

*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.

Our goal is to understand whether and how visual adaptation contributes to species diversification. Specifically, we test the hypothesis that visual plasticity promotes speciation by facilitating the colonisation of novel visual niches and by niche segregation.

Our short-term behavioural experiments (Part 2) are required to study these mechanisms in detail, but are not sufficient to estimate the long-term fitness effects for individuals facing intra- and interspecific competition, as they would in nature. Therefore, we will conduct competition experiments in mesocosm communities, to quantify how visual plasticity and visual pigment genotype affect visual niche expansion and niche segregation. We hypothesise that visual plasticity contributes to survival in novel visual environments and induces visual niche segregation which promotes coexistence.

Outcome parameters: we will quantify growth, survival and spatial segregation in a community setting. We will then assess 1) whether species with high visual plasticity are at a competitive advantage and 2) whether they preferentially use the visual environment that they have adjusted to.

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.

Using the visual plasticity data (Part 1), we will select species with high and low plasticity (total n=6 species). Juveniles of all species will be raised in the lab under both B and N conditions until ~4 months of age. We will then introduce these fish into the ponds, in which three different light environments will be implemented: broad-spectrum (B), yellow-shifted narrow spectrum (N), and a combined treatment (BN) in which each light regime covers half of the pond.

We will conduct two sets of experiments:



1) In B and N ponds, we will introduce about 30 individuals each of a high-plasticity and a low-plasticity species (i.e. 2x30 fish). In half of the ponds, the fish of both species will come from the same light treatment as the one implemented in the pond ("match" condition). In the other half, all fish will come from the other light treatment ("mismatch" condition). We will then monitor growth and survival by catching and measuring (length, weight) all fish every 2 weeks. We test the prediction that in novel visual environments, high-plasticity species outcompete low-plasticity species, using the "match" condition as control. Experiments will be replicated for at least 3 species pairs.

2) In NB ponds, we will introduce individuals from the same species pairs, but this time including fish from both rearing environments (i.e. 4x15 fish). We will monitor spatial segregation between the two light regimes to test the prediction that visual pigment expression plasticity influences niche segregation and community dynamics: in species with high plasticity, individuals from different rearing environments will segregate between the two visual zones, while low-plasticity species will not show such segregation. We also test whether growth and survival will be higher for high-plasticity species. These ponds will be equipped with antennas to register fish spatial position and all fish will be PIT-tagged (Passive Integrated Transponder).

Pond temperature will be kept at 24-26 °C. Temperature and water quality parameters will be monitored weekly. All ponds will be fitted with mesh inlays to facilitate catching the fish. On top of these inlays we put artificial shelters (PVC tubes) that will be removed before lifting the inlays for catching. Before and after the experiments, DNA will be collected. This serves two purposes: first, to confirm visual pigment genotype (if species are polymorphic, i.e. harbour multiple pigment genotypes) and second to identify individuals (in experiment 1 only: to determine which individuals have died). After the experiments, fish will be sacrificed for visual pigment expression analysis. Fish will be monitored daily; dead or sick individuals will be removed and sampled (see below).

The experiments will run for 3 months. This restricted period is chosen for the following reasons. 1) We will run the experiment in the summer months, when it is feasible to keep the ponds warm. 2) With a longer running period, the fish would reach sexual maturity and engage in territorial and reproductive behaviours. This could interfere with ecologically driven variation in behaviour and fitness, and may also cause welfare problems due to heightened aggression. 3) Running these experiments requires a major effort of the researchers, which can only be sustained for a restricted period of time.

---

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

---

Number of species: to compare low- and high-plasticity species, while controlling for visual genotype, we estimate that we need three species pairs. We think that this is a reasonable compromise between minimising the number of experimental animals and maximising the generality of our conclusions.

Number of individuals: there are no studies that have quantified the effect of visual plasticity on community-level processes. We aim for groups of about 60 individuals, based on the following considerations.

On the one hand:

- density should be high enough to induce competitive interactions;
- absolute numbers per group should be high enough to detect potentially subtle differences in growth and survival.

On the other hand:

- densities should be low because the ponds are not filtered continuously but will only have an air supply (water quality will be monitored). Groups of 60 fish translate to a density of about 1 fish per 50 liters of water, which is much lower than in our aquarium system (at least 10 liter per individual).

In addition:

- in aquaria, low fish densities can lead to aggression problems. We do not expect this in the ponds because we use juveniles and problematic aggression typically starts at sexual maturity. Also, ponds will have ample space to hide or stay away from aggressive individuals.
  - we have kept cichlids under similar conditions in Africa, when preparing to ship them to Europe. XXXXXXXXXX
-

Regarding the statistical procedures, data will be analysed using Generalized Linear Mixed Models. This approach allows us to analyse all experimental factors (treatment, species) in a single model, to control for family effects, and to aggregate the dataset at different levels (e.g. combining species, families and treatments in order to estimate the effects of single variables).

## B. De dieren

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

Species: species selection will be done based on the results obtained in Part 1.

Origin: African cichlids are popular in the aquarium hobby and many species can be obtained from commercial exporters. For species that are difficult to obtain commercially, we will ask the assistance of the cichlid research community.

Numbers:

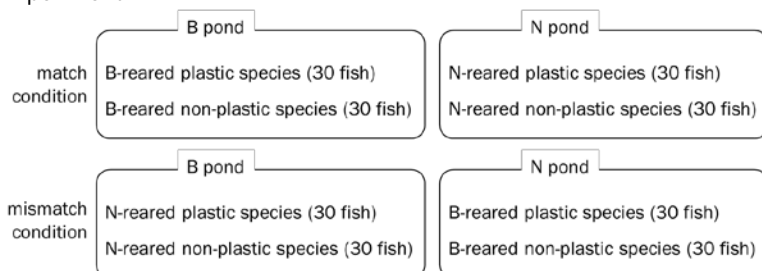
In Experiment 1, we introduce two groups of fish in each pond (see Figure below), originating from 2 species and raised in the same light environment (either B or N; see Part 1). To achieve a density of 60 individuals per pond, each group will consist of 30 fish. Each species tested will be represented in 2 match and 2 mismatch conditions, with each species combination tested 2x, thus requiring a total of 240 fish per species (2 replicates \* 4 conditions \* 30 fish). Clutch sizes in African cichlids range from 20 to 120; we thus expect that we need to breed 4-8 families. Experiments will be conducted for 3 species pairs, generating a total of 1440 fish (6 species \* 240 fish per species).

In Experiment 2, both light conditions are implemented in each pond. We introduce four groups of fish into the ponds (see Figure below), originating from 2 species, and from both light environments (B and N). To achieve a density of 60 individuals per pond, each group will consist of 15 fish. Each species tested will be represented in 2 replicates, thus requiring a total of 60 fish per species (2 replicates \* 4 conditions \* 30 fish). To ensure genetic diversity, these will be generated by breeding 3 families. Experiments will be conducted for 3 species pairs, generating a total of 360 fish (6 species \* 60 fish per species).

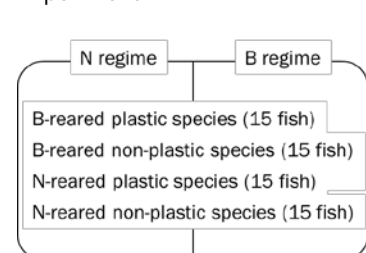
In both experiments, we will use both males and females; reproduction will not occur because fish are not yet sexually mature.

Grand total = 1440+360 = 1800 fish.

### Experiment 1



### Experiment 2



## C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

Replacement: Not applicable; we are interested in the fish themselves and therefore need to study the live organism.

Reduction: this experiment requires large numbers of fish in order to detect potentially subtle effects. Smaller group sizes would compromise our ability to find statistically significant results, and would also generate densities that are suboptimal for fish welfare. To minimise the number of animals, while at the same time allowing general conclusions, we use a limited number of species and replicates.

Refinement: the experimental light conditions are within the natural range experienced by cichlid fish. Water quality and temperature will be continuously monitored. Fish will be fed with a diverse range of commercial pellets and flakes, frozen invertebrates and algae, and occasionally live food. Both ponds and aquaria will have pvc tubes for shelter. Catching the fish every 2 weeks represents a compromise between maximising data collection and minimising stress for the fish.

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.

In addition to the above, fish will be housed in groups which corresponds to the natural situation. We do not expect problems of aggression, because this typically starts when the fish approach sexual maturity. At this time the fish will be housed in the ponds where there is ample space to hide or stay away from aggressive individuals.

Experiments will not have detrimental effects on the environment.

### **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.

We are very well connected to the cichlid research community and collaborate with the experts on the cichlid visual system. The effects of plasticity at the community level have not been investigated.

### **Huisvesting en verzorging**

#### **F. Huisvesting en verzorging**

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

Nee

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

#### **G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest**

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse

verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt?

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

As a result of suboptimal visual conditions (some fish are not well adapted to the light regime) and competitive interactions, some fish may experience stress and/or injury.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Suboptimal visual conditions (some fish are not well adapted to the light regime) and competitive interactions.

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

Fish welfare is monitored daily. Fish that are not doing well (see below) will be taken out of the ponds and sacrificed for analyses. These individuals will be included in the estimates of growth and survival.

### 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.

Body condition: fish that are skinny and/or damaged due to aggression.

Behaviour: fish that stay at the water surface or that do not swim normally.

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

Based on our experience in previous and ongoing experiments in cichlids, in laboratory aquaria as well as outdoor ponds: 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.

Fish that survive until the end of the experiment: licht

Fish that do not survive (dying in the pond or terminated during the experiment): 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.

Visual pigment expression can only be measured by taking the retina out of the fish.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

# Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: (Intern RUG code **9009**)

Titel van het project: **Alternative mechanisms of visual adaptation: evolutionary causes and consequences in cichlid fish**


2. Titel van de NTS: **Verschillende mechanismen van visuele aanpassing: evolutionaire oorzaken en gevolgen in cichlide vissen**

3. Type aanvraag:

**nieuwe aanvraag projectvergunning**

4. Contactgegevens DEC:

naam DEC : **DEC-RUG**

telefoonnummer contactpersoon: 

mailadres contactpersoon : 

5. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: **10-02-2016**
- aanvraag compleet: **10-02-2016**
- in vergadering besproken: **18-02-2016**
- anderszins behandeld: **09-03-2016**
- termijnonderbreking(en) van / tot: **19-02-2016 tot 06-03-2016**
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen. **n.v.t.**
- aanpassing aanvraag: **06-03-2016**
- advies aan CCD: **15-03-2016**

6. 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 wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

#### 7. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **19-02-2016**
- Strekking van de vraag / vragen:
  - **Vragen/opmerkingen t.a.v. Bijlage 1 – Quantifying plasticity**
  - Waarom heeft men de gehele clutch size (50 expl.) nodig? Dit wordt niet (statistisch) onderbouwd. Kunt u dit beter onderbouwen?
  - Ook het aantal van 3 families per species wordt niet echt onderbouwd: *“it should be enough to detect () effects.”*. Kunt u dit beter onderbouwen?

Omdat de keuze voor zowel het aantal van 3 families per soort en 50 offspring per familie niet helder is, is de argumentatie dat er niet met minder vissen gewerkt kan worden (een van de drie V's) niet sterk.

- **Vragen/opmerkingen t.a.v. bijlage 2 – Behavioural traits**
- Ook hier is de argumentatie voor het aantal vissen niet echt helder. Zo wordt er gesteld dat 3 of 4 families per soort zullen worden gebruikt .. *as in Part 1..* terwijl in het betreffende deel van Part 1 sprake is van slechts 3 families.
- Graag een onderbouwing geven waarom de duur van de verschillende testen (habitat choice: 1-2 uur, foraging performance: 20 minutes, female mate choice: 1 hour) voldoende is.
- De onderbouwing van het aantal van 15 (groepen/mannetjes /vrouwtjes) is niet traceerbaar. Er wordt wel verwezen naar poweranalyses van voorgaand en lopend onderzoek: dat is wel erg mager.
- Reduction (onderdeel D): ook hier wordt gesteld dat 3 of 4 families wel voldoende zullen zijn om effecten te zien. Er mist een uitleg waarom het totaal aantal van 720 vissen niet minder kan zijn.
- **Vragen/opmerkingen t.a.v. bijlage 3 – Mecocosm experiments**
- Evenals in experimenten 1 en 3 is de onderbouwing van de aantallen niet duidelijk. Er worden nu 6-8 families ten tonele gebracht zonder uitleg waarop dit aantal is gebaseerd.
- Datum antwoord: **06-03-2016**

**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.**

#### 8. 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 **Ja**.
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 **substantieel**.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie / aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. **De aanvraag presenteert een onderzoeksstrategie waarin vier afzonderlijke en goed beschreven deelprojecten een gezamenlijk beeld over soortvorming zullen opleveren. De experimenten die zijn voorgesteld zijn goed opgezet, haalbaar en gangbaar in dergelijk onderzoek. De onderzoekers zullen gebruik maken van cichlide vissen, een groep vissen waarbinnen een grote soortdiversiteit bestaat en waarvan bekend is dat zowel genetische wijziging als fenotypische plasticiteit voorkomen. Zij zijn bovendien gemakkelijk in gevangenschap te houden en te kweken. Onderzoekers hebben veel ervaring met diverse onderzoekingen aan**



**deze vissen. Een en ander blijkt uit opgenomen referenties**

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 onderzoekers gebruiken gangbare diersoorten en behandelingen, de keuze hiervoor is wetenschappelijk voldoende onderbouwd**
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. **Ja, het ongerief is realistisch ingeschat**
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. **Nee, dergelijk onderzoek gericht op het begrijpen van soortvorming kan alleen met levende organismen worden uitgevoerd.**
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren lijkt realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. **Ja. Het aantal in de proeven in te zetten vissen is zorgvuldig vastgesteld en onderbouwd op basis van enerzijds het gebruik van zo weinig mogelijk dieren en anderzijds het minimum aantal dat vereist is om statisch betrouwbare en betekenisvolle resultaten te verkrijgen. Geslachten worden waar mogelijk in gelijke mate cq proportioneel ingezet. Geslacht speelt geen rol in die experimenten waar nog niet-geslachtsrijpe vissen worden gebruikt. Er wordt alleen vis gekweekt voor dit project en indien er te weinig vis beschikbaar is, wordt uit de markt gekocht.**
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de behandeling van de dieren zo humaan mogelijk wordt uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. **Ja. Het toepassen van lichtregimes die binnen de range van natuurlijke lichtomstandigheden vallen, continue omgevingsmonitoring (waterkwaliteit, temperatuur), huisvesting in zo natuurlijke mogelijke omstandigheden en toepassen van natuurlijke dichtheden in de opstellingen beperken het ongerief maximaal.**

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

## **D. Ethische afweging**

Het project "Alternative mechanisms of visual adaptation: evolutionary causes and consequences in cichlid fish" betreft fundamenteel onderzoek naar het ontstaan van soorten. Hoe bepalend zijn evolutionaire aanpassing onder veranderende omstandigheden via een wijziging van de genetische samenstelling van een populatie en de plastische respons van individuen binnen deze soort? Het wetenschappelijke belang van dit onderzoek rechtvaardigen het gebruik van vissen en het ongerief dat deze dieren wordt aangedaan. Het is zeer waarschijnlijk dat de onderzoeksdoelen worden gehaald. Het onderzoek heeft tot doel onze kennis over het ontstaan van soorten te vergroten, met een focus op genetische wijziging en fenotypische plasticiteit. Het onderzoek is goed uitgewerkt in een duidelijke en navolgbare onderzoeksstrategie waarbij door gebruik te maken van een viertal deelprojecten de haalbaarheid wordt vergroot met een helder gedefinieerd go-no go moment. De zorgvuldige onderzoeksopzet heeft geresulteerd in het gebruik van een een tot het minimum beperkt aantal vissen. Het ongerief waaraan deze worden blootgesteld is voor het merendeel van de vissen licht; voor een kleiner deel matig. De opzet is zodanig gekozen dat pijn en stress tijdens de experimenten worden vermeden of tenminste zoveel mogelijk gereduceerd. Expliciet is aandacht gegeven aan het natuurlijke gedrag van de vissen in de experimenten: vissen worden in groepen getest onder (waar mogelijk) natuurlijke omstandigheden (mesocosms). De opzet en doeleinden rechtvaardigen het gebruik van de genoemde aantallen vissen en het daarbij beschreven ongerief. De onderzoeksgroep is zeker gekwalificeerd voor dit onderzoek. Zij beschikt over voldoende expertise om te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. Per onderzoeksdoel is de wetenschappelijke navolgbaarheid goed in

**beeld gebracht en zijn de aantallen benodigde dieren inzichtelijk onderbouwd. Technieken, aquarium faciliteiten en mesocosms worden recentelijk in lopend onderzoek gebruikt.**

**Naar de mening van de DEC-RuG is sprake van een toetsbare eenheid.**

**Op grond van alle voor de afweging relevante argumenten komt de DEC-RuG tot de conclusie dat dit onderzoek ethisch toets- en toelaatbaar is en derhalve adviseert zij de CCD tot vergunningverlening.**

## **E. Advies**

### 1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op **consensus**.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan  
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  
AVD105002016464

**Bijlagen**

2

Datum 16 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002016464. 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 [REDACTED]  
Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN  
IBAN: NL45ABNA0474567206  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Rijksuniversiteit Groningen

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

Gegevens gemachtigde

Postcode en plaats: GRONINGEN

**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 april 2016  
Geplande einddatum: 28 april 2021  
Titel project: Alternative mechanisms of visual adaptation: evolutionary causes and consequences in cichlid fish  
Titel niet-technische samenvatting: De rol van visuele aanpassing bij het ontstaan van nieuwe soorten  
Naam DEC: DEC-RUG  
Postadres DEC: A. Deusinglaan 1, [REDACTED]  
E-mailadres DEC: secrdec.umcg@umcg.nl

**Betaalgegevens**

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

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam: [REDACTED]  
Functie: [REDACTED]  
Plaats: GRONINGEN



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan

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  
AVD105002016464

**Bijlagen**

2

Datum 16 maart 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 16 maart 2016

Vervaldatum: 15 april 2016

Factuurnummer: 16700464

| Omschrijving   | Bedrag     |
|--|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD105002016464 | € 1.441,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.





## Centrale Commissie Dierproeven

> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan  
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  
AVD105002016464  
**Bijlagen**  
1

Datum 26 april 2016

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 15 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Alternative mechanisms of visual adaptation: evolutionary causes and consequences in cichlid fish" met aanvraagnummer AVD105002016464. 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 voorwaarde zoals genoemd in de vergunning. In het kader van vermindering wordt een algemene voorwaarde gesteld om te voorkomen dat dieren onnodig worden gebruikt. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, subid 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 "Alternative mechanisms of visual adaptation: evolutionary causes and consequences in cichlid fish" starten. De vergunning wordt afgegeven van 28 april 2016 tot 28 april 2021.

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 15 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over,

inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering, met uitzondering van de voorwaarde zoals hierboven gemotiveerd. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

#### **Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

#### **Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma  
plv Algemeen Secretaris

#### **Bijlagen:**

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

## Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Rijksuniversiteit Groningen

Adres: A. Deusinglaan

Postcode en plaats: 9713 AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 28 april 2016 tot 28 april 2021, voor het project "Alternative mechanisms of visual adaptation: evolutionary causes and consequences in cichlid fish" met aanvraagnummer AVD105002016464, 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 15 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per op 15 maart 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per op 15 maart 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 15 maart 2016, ontvangen op 15 maart 2016.

| Naam proef             | Diersoort/ Stam   | Aantal dieren | Ernst       | Opmerkingen |
|------------------------|---|---------------|-------------|-------------|
| Quantifying plasticity | Andere vissen (andere Pisces)<br>/<br>African cichlids; verschillende stammen | 1080          | Licht       |             |
| Behavioural trials     | Andere vissen (andere Pisces)<br>/<br>African cichlids; verschillende stammen | 720           | Licht       |             |
| Mesocosm experiments   | Andere vissen (andere Pisces)<br>/<br>African cichlids; verschillende stammen | 1800          | Matig Licht |             |

### 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 Instantie voor Dierenwelzijn.

In artikel 10, sublid 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.

**Van:** Info-zbo  
**Verzonden:** dinsdag 26 april 2016 15:54  
**Aan:** [REDACTED]  
**Onderwerp:** Terugkoppeling over projectvergunningsaanvraag AVD105002016464

Geachte DEC-RUG,

Op 15-03-2016 hebben wij een aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen waarover uw DEC advies heeft uitgebracht. Het gaat om het project 'Alternative mechanisms of visual adaptation: evolutionary causes and consequences in cichlid fish' met aanvraagnummer AVD105002016464.

De CCD heeft de aanvrager geen aanvullende vragen gesteld.

We danken u voor uw advies en we koppelen graag het besluit van de CCD terug. De CCD heeft besloten de aanvraag toe te wijzen.

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

Mocht u vragen hebben over onze beslissing, dan kunt u uiteraard contact met ons opnemen.

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)

| Inventaris Wob-verzoek W16-16S |  |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
|--------------------------------|--|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
|                                |  | wordt verstrekt |      |        |       | weigeringsgronden |        |        |      |
| nr.                            | document                                   | reeds openbaar  | niet | geheel | deels | 10.1.c            | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
|                                | <b>NTS2016465</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      | x      |      |
| 5                              | Bijlage beschrijving dierproeven 2 oud     |                 |      |        | x     | x                 |        | x      |      |
| 6                              | Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud     |                 |      |        | x     | x                 | x      | x      |      |
| 7                              | DEC-advies                                 |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 8                              | Ontvangstbevestiging                       |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 9                              | Verzoek aanvulling aanvraag                |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 10                             | Projectvoorstel herzien                    |                 |      |        | x     | x                 |        | x      |      |
| 11                             | Niet-technische samenvatting herzien       | x               |      |        |       |                   |        |        |      |
| 12                             | Bijlage beschrijving dierproeven 1 herzien |                 |      |        | x     | x                 | x      | x      |      |
| 13                             | Bijlage beschrijving dierproeven 2 herzien |                 |      |        | x     | x                 |        | x      |      |
| 14                             | Bijlage beschrijving dierproeven 3 herzien |                 |      |        | x     | x                 | x      | x      |      |
| 15                             | Reactie verzoek aanvulling 12-5-2016       |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 16                             | Advies CCD                                 |                 | x    |        |       |                   |        |        | x    |
| 17                             | Beschikking en vergunning                  |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |

17 MAART 2016



AVD 105002016465

## 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?<br><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   | 01179037   |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in.<br><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   |  |
|     |   | Tenaamstelling van het rekeningnummer                              |  |
| 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  | Universitair docent  |
|     |   | Afdeling   |  |
|     |   | 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  | Universitair docent  |
|     |   | Afdeling   | [REDACTED]   |
|     |   | Telefoonnummer   | [REDACTED]   |
|     |   | E-mailadres  | [REDACTED]   |



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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |               |
|------------|---------------|
| Startdatum | 1 - 4 - 2016  |
| Einddatum  | 31 - 3 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- De rol van aneuploidie in kanker
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- De rol van aneuploidie in 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, [REDACTED] |
| E-mailadres | secrdec.umcg@umcg.nl         |

## 4 Betaalgegevens

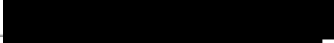
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1441 Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
 Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.
- Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur


## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening

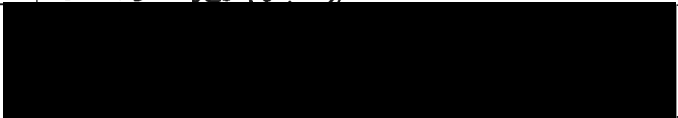
- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

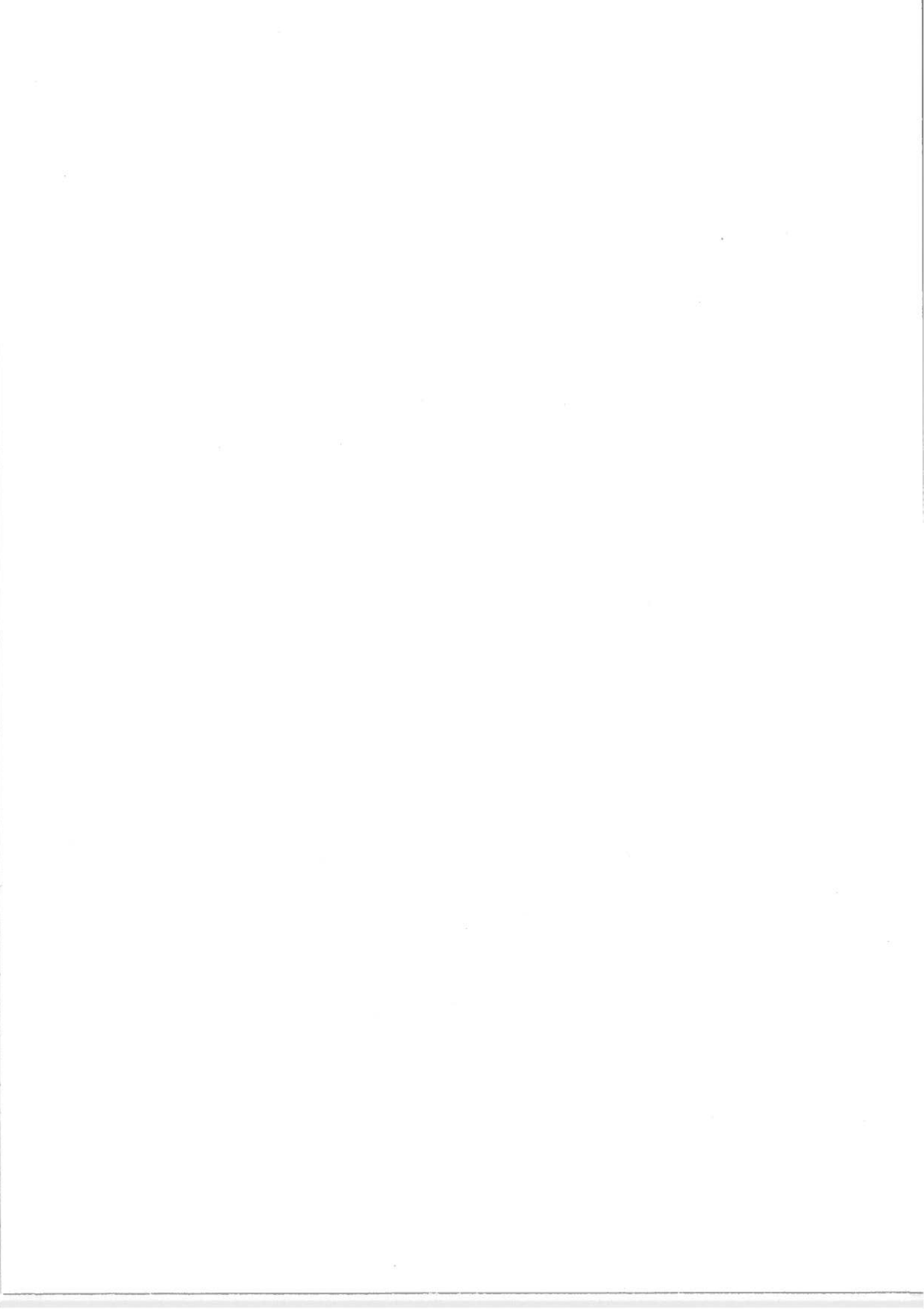
Naam 

Functie 

Plaats GRONINGEN

Datum 16-03-2016

Handtekening 





## Format Projectvoorstel dierproeven

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

Elke celdeling wordt ons erfelijk materiaal gerepliceerd en verdeeld over de twee nieuwe ontstane dochtercellen. Soms maken cellen een fout bij het verdelen van de chromosomen en ontstaan er twee cellen met een afwijkende hoeveelheid DNA. Dit proces noemen we chromosomale instabiliteit; de cellen met afwijkende hoeveelheden chromosomen noemen we aneuploïde. Kankercellen maken dit soort van fouten frequent en **twee van de drie tumoren zijn dan ook aneuploïde**. Omdat de omliggende gezonde cellen zelden tot niet aneuploïde zijn, vormt aneuploïdie een veelbelovend aangrijppunt voor kankertherapie. Om tot zulke therapie te kunnen komen, moeten we eerst beter begrijpen waarom de meeste kankers aneuploïde zijn en dus wat de gevolgen zijn van aneuploïdie voor het ontstaan van kanker.

Hiertoe zijn in de afgelopen 15 jaar diverse muismodellen gemaakt waarin systemisch (dus in alle weefsels van de muis) aneuploïdie werd geprovoceerd. In deze modellen werden genen uitgeschakeld in het 'mitotic spindle checkpoint', een mechanisme dat in mitose bepaalt of alle chromosomen correct gebonden zijn aan de mitotische spoel. Het inactiveren van dit mechanisme leidt tot frequente fouten in de chromosoomverdeling en dus tot aneuploïdie. Het systemisch inactiveren van genen in het mitotic spindle checkpoint leidt in alle gevallen tot vroege embryonale letaliteit (~E6.5). Heterozygote dieren lieten milde aneuploïdie zien en in sommige gevallen een iets verhoogde frequentie van kankers (als de dieren een kankerpredispositie lieten zien, ontwikkelde ongeveer 1/3 van de dieren tumoren na 18-24 maanden) (zie voor review: ██████████). In veel gevallen waren deze dieren wel gevoeliger voor geïnduceerde kankers (bijvoorbeeld door het inactiveren van ██████ of het blootstellen aan carcinogene stoffen). Samengevat hebben deze modellen ons geleerd dat chromosomale instabiliteit kanker versnelt maar dat het (in de muis) geen primaire oorzaak is van kanker. Verder lieten enkele van de modellen versnelde veroudering zien, wat suggereert dat aneuploïdie ook gerelateerd is aan veroudering. Ondanks dat deze modellen wel de relatie tussen aneuploïdie, kanker en veroudering hebben geschetst, zijn deze modellen minder geschikt om de moleculaire gevolgen van aneuploïdie in kanker te onderzoeken, omdat de tumoren in deze modellen zeldzaam zijn, in diverse weefsels ontstaan en pas laat in het leven van de muis. Om in deze modellen de gevolgen van aneuploïdie in kaart te brengen zouden onnodig veel dieren nodig zijn.

Wij hebben daarom conditionele knockout (cKO) muizen gemaakt, waarin we in weefsels naar keuze het mitotic spindle checkpoint kunnen uitschakelen (██████████) of verzwakken (██████████ cKO). Middels deze modellen onderzoeken we wat te moleculaire gevolgen zijn van aneuploïdie voor weefselontwikkeling, en verder hoe aneuploïdie leidt tot kanker. In deze modellen kunnen we ernstige aneuploïdie veroorzaken op weefselniveau en op deze wijze hebben we een tumormodel (T-cell acute lymphoblastic lymphoma) kunnen ontwikkelen, waarin 100% van de muizen binnen 3 maanden (██████████) (██████████) of 4 maanden (██████████) aneuploïde lymphomen ontwikkelen. Dankzij deze modellen hebben we een zeer reproduceerbaar en gedefinieerd tumorcohort kunnen genereren, en kunnen we beter de moleculaire gevolgen van aneuploïdie in kaart brengen.

Zoals de eerdere modellen al suggereerden, laten ook onze modellen zien dat chromosomale instabiliteit alleen niet voldoende is voor kanker. We hebben dit

laten zien in T-cellen ( ), de lever ( ) en de huid ( ), wat aangeeft dat aneuploïde cellen nog extra mutaties nodig hebben om te transformeren in aneuploïde kankercellen. Daarnaast hebben we gevonden dat verschillende celtypen op verschillende wijze omgaan met aneuploïdie. Zo blijken T-cellen ( ), levercellen ( ) en basal epidermal cells ( ) vrij goed tegen aneuploïdie te kunnen, in tegenstelling tot bijvoorbeeld de bulge stamcellen van de huid, die in de haarfollikel liggen ( ). Dit laatste type cellen gaat net als cellen in weefselweek relatief snel dood (Kops et al, PNAS, 2004 Jun 8;101(23):8699-704) t.g.v. aneuploïdie. Dit geeft aan dat de verschillende celtypen op verschillende wijze omgaan met aneuploïdie en benadrukt het belang van weefselspecifieke knockouts om the komen tot therapieën die selectief aneuploïde kankers aanpakken.

### 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?

Ondanks dat twee van de drie kankers aneuploïde zijn, leidt aneuploïdie in weefselweek tot een groeinadeel, niet een groeivoordeel (Kops GJPL et al, Proc Natl Acad Sci USA. 2014;101:8699–704); (Williams BR, et al Science; 2008; 322:703–709). Dit suggereert dat aneuploïde kankercellen zich aan hebben weten te passen aan de nadelen van aneuploïdie. Dit betekent ook, dat als we beter begrijpen hoe aneuploïde kankercellen omgaan met de (nadelige) gevolgen van aneuploïdie, we mogelijk kunnen komen tot manieren om aneuploïde kankercellen selectief te doden, het lange-termijn doel in mijn lab. Daarvoor moeten we in eerste instantie beter begrijpen hoe kankercellen en niet-kwaadaardige cellen omgaan met aneuploïdie. Hiervoor hebben we conditionele knockout allelen gegenereerd (voor ( ) en ( )) waarmee we aneuploïdie kunnen provoceren op weefselspecifiek niveau. Deze modellen stellen ons, in tegenstelling tot de vroegere modellen, in staat om gestructureerd te onderzoeken hoe weefsels en tumoren omgaan met aneuploïdie en hoe dit leidt tot kanker ( ). We onderzoeken hoe cellen aneuploïde worden, hoe aneuploïdie cellen helpt om kwaadaardig te worden en wat de fysiologische gevolgen zijn van aneuploïdie. Hiertoe stellen we in eerste instantie **drie vragen**:

1. Wat zijn de gevolgen van aneuploïdie voor 'niet-kankercellen'? Om deze vraag te beantwoorden brengen we de gevolgen van aneuploïdie in kaart in diverse weefsels (bijv. huid, lever, bloed, hersenen, mamma, darm). Hiervoor maken we gebruik van onze bestaande conditionele knockout allelen ( ) en ( ) gecombineerd met weefselspecifieke Cre-drivers achtergronden en zullen we vergelijken hoe verschillende weefseltypen omgaan met de gevolgen van aneuploïdie. Hiertoe zullen we dieren volgen in de tijd en op verschillende tijdstippen (maximaal tot een leeftijd van 18 maanden) opofferen en de weefsels in detail analyseren (transcriptome, proteome, epigenome, etc.) Een van de mogelijke gevolgen van aneuploïdie is versnelde veroudering (zie ook het werk van ( )). We zullen de relatie tussen aneuploïdie, veroudering en kanker dan verder onderzoeken als onderdeel van deze vraag door te bepalen of het aneuploïde weefsel (en mogelijk omliggende weefsels) verouderings-pathologie laten zien (stamceldepletie, neurodegeneratie, lineage skewing, weefseldegeneratie, etc.). We zullen de aneuploïdie-geïnduceerde pathologie vergelijken met 'normaal' verouderde muisweefsels, te verkrijgen uit de *Mouse Clinic for Cancer and Ageing*.
2. Wat is de rol van aneuploïdie in het ontstaan en de voortgang van kanker? Om deze vraag te beantwoorden, stellen we een drietal deelvragen:

- a. *Welke veranderingen in de cel maken van aneuploïde cellen aneuploïde kankercellen?* Chromosomale instabiliteit alleen is niet voldoende om efficiënt kanker te provoceren in de muis en daarnaast leidt chromosomale instabiliteit in niet getransformeerde cellen tot een groeinadeel en geen groeivoordeel. Om beter te begrijpen welke genen belangrijk zijn om van een aneuploïde cel een aneuploïde kankercel te maken, willen we *in vivo* weefsel-specifieke transposonscreens uitvoeren in een aneuploïde achtergrond, waarbij we aneuploïde cellen *in vivo* mutageniseren met transposons (induceerbaar PiggyBac transposonsysteem, (Rad et al, Nat. Gen. 2015 Jan;47(1):47-56)). PiggyBac is een transposon dat met PiggyBac transposase te mobiliseren is en dan random integreert. Het construct dat we gebruiken zal bij integratie in of nabij een gen leiden tot inactivatie of activatie van dat gen (afhankelijk van waar het integreert). De PiggyBac transposonlijnen hebben voordat PiggyBac transposase actief is een tandem van transposons geïntegreerd op 1 chromosoom, waar ze niets doen. Als PiggyBac transposase geactiveerd wordt, mobiliseren de transposons en integreren ze random in het genoom van de hostcellen, wat daardoor gemutageniseerd wordt. Omdat PiggyBac transposase door Cre-recombinase geactiveerd wordt, kunnen we de mutagenese beperken tot de weefsels waarin we de aneuploïdie provoceren. Omdat we verschillen zien in hoe weefsels reageren op genomische instabiliteit, willen we deze screens ook uitvoeren in verschillende weefsels (bloed, hersenen, huid, darm, etc.). Hiertoe worden conditional aneuploïde mutanten ingekruist met het induceerbaar PiggyBac transposonsysteem en verschillende Cre-drivers om weefsel-specificiteit te bewerkstelligen. Cohorten dieren worden dan gevolgd op het ontstaan van tumoren en geëuthanaseerd zodra ze ziek worden. Tumoren worden vervolgens geïsoleerd en geanalyseerd op waar de transposons geïntegreerd zijn, gevolgd door moleculair (*in vitro*) onderzoek, wat uiteindelijk *in vivo* gevalideerd dient te worden zoals beschreven onder 2c.
- b. *Hoe gaan diverse typen kankercellen om met (de gevolgen van) aneuploïdie?* Ons voorafgaand werk heeft aangetoond dat aneuploïdie in T-cellen niet voldoende is voor kanker, maar dat er daarnaast initiating events (zoals mutatie van [REDACTED]) nodig zijn. Omdat we zeer duidelijke weefsel-specificiteit zien in hoe (kanker)cellen omgaan met aneuploïdie ([REDACTED]) willen we ook in andere weefsels kijken (onder meer in hersenen, huid, darm en in mammaweefsel) of aneuploïdie ook in die weefsels een predispositie geeft voor kanker. Hiervoor gebruiken we dezelfde aneuploïdie-induceerbare muismodellen als onder vraag 1, maar nu gecombineerd met genetische (bijv. [REDACTED] verlies, c-Myc inductie, Ras<sup>V12</sup> mutatie, etc.) of chemische kankerpredisposities (bijv. DMBA/TPA protocol). Naast 'educated guesses', combineren we aneuploïdie ook met het activeren/inactiveren van genen waarvan we op basis van ons voorgaand werk een sterk vermoeden hebben dat ze samen met aneuploïdie leiden tot kanker. We kijken dan of muteren van deze genen leidt tot aneuploïde kankers en zo ja, of deze lijken op hun humane evenknie. Deze tumorcohorten worden vervolgens in groot detail geanalyseerd (hoe aneuploïde zijn de tumoren, hoe hard groeien ze, etc.) en onderling vergeleken om aan de ene kant de weefsel-specificiteit beter te begrijpen en aan de andere kant te onderzoeken of ook gemeenschappelijke factoren een rol spelen bij het ontstaan van aneuploïde kanker.
- c. *Hoe chromosomaal instabiel zijn aneuploïde tumoren en hebben aneuploïde tumoren een groeinadeel?* Ondanks dat 2 van de 3 kankers aneuploïde zijn, is een huidig dogma in het veld dat aneuploïde kankercellen, ondanks hun afwijkende aantal chromosomen in de uiteindelijke tumor weinig onderling verschillende karyotypes laten zien. Met andere woorden: de cellen maken uiteindelijk maar weinig fouten in het verdelen van hun erfelijk materiaal. Onze preliminaire data suggereert dat dit dogma onjuist is: er blijken op individueel cel niveau juist wel subtiele verschillen te bestaan tussen karyotypes die extrapoleren op het moment dat de tumor in een andere omgeving (de muis) gebracht wordt. Aangezien tumortherapie ook als een druk op de tumor gezien kan worden, is onze verwachting dat het meten van de chromosoom-missegregatie en karyotype-heterogeniteit in tumoren een belangrijke prognostische factor zal worden voor (aneuploïde) kanker. Om deze hypothese verder te toetsen zullen we in meerdere aneuploïde kankers meten hoe vaak cellen chromosomen missegregeren als ze in een andere omgeving (niche) geplaatst worden. Hiertoe zullen we kankers uit verschillende weefsels transplanteren in de muis en voor en na transplantatie de karyotype heterogeniteit op individueel cel niveau meten met single cell sequencing (Falconer E,

et al/ Nat Methods; 2012; 9:1107–1112). Daarnaast zullen we de groeisnelheid van aneuploïde tumoren en niet aneuploïde tumoren vergelijken om te testen of aneuploïde tumoren nog steeds een groeinadeel ondervinden van de aneuploïdie en bepalen welk type veranderingen dit eventuele groeinadeel omzet in een groeivoordeel.

3. Hoe gedragen aneuploïde cellen zich *in vivo* en *in vitro*? Onze drivers voor chromosomale instabiliteit (verlies, truncatie) leiden in weefselkweek binnen een aantal passages tot celdood. Ons voorgaand werk laat duidelijk zien dat verlies/ truncatie wel getolereerd worden in een *in vivo* setting (lever, huid, T-cellen). Dat betekent dat er grote verschillen zijn in hoe weefselkweekcellen en cellen *in vivo* reageren op aneuploïdie. Om dit beter te begrijpen, ontwikkelen wij muismodellen om chromosoomsegregatie en aneuploïdie *in vivo* te visualiseren middels intravital imaging. Deze transgene muismodellen zullen conditioneel diverse fluorescente reporters ( ; ) tot expressie brengen en daarnaast een 'chromosoom tracker' waarmee we een specifiek getagged chromosoom kunnen volgen *in vivo* als een marker voor aneuploïdie. Deze modellen zullen we kruisen met onze muismodellen voor aneuploïdie (zie vraagstellingen 1, 2) in enkele weefsels (bijv. huid, darm). De transgenen en conditionele knockout allelen zullen dan *in vivo* geactiveerd worden met tamoxifen gevolgd door intravital imaging. Daarnaast zullen we ook weefsels isoleren van deze muizen voor organoid kweek. Op deze wijze kunnen we *in vivo* en *in vitro* gedrag van aneuploïde cellen vergelijken en daarnaast onze tracker modellen.

**Haalbaarheid:** De hierboven benoemde vragen kunnen we beantwoorden met de dierexperimenten beschreven in dit voorstel. Voor alle benoemde technieken en benaderingen hebben we of de modellen al beschikbaar, of kunnen we de modellen genereren samen met . In vraag 2 en 4 genereren we een aantal nieuwe muismodellen. Hiervoor zullen we voor het genereren van de muizen samenwerken met de die brede ervaring heeft hiermee. Voor vragen 1 en 3 maken we gebruik van bestaande modellen die we inkruisen in nieuwe weefsel-specifieke drivers (te verkrijgen via ) eventueel gecombineerd met chemische mutagenese. Hiervoor maken we gebruik van bestaande protocollen. Vraag 2a betreft het screenen voor en valideren van genen die samen met aneuploïdie tot kanker leiden. Onze eerdere pilot-screens hebben laten zien dat deze aanpak zeer efficiënt werkt in T-cellen. We hebben al ervaring met aneuploïdie in andere weefsels (lever, huid) en kunnen deze screen dus eenvoudig in andere weefsels herhalen. Voor vraag 3 zullen we chromosoomsegregatie en aneuploïdie middels intravital imaging volgen. We hebben hier al ervaring mee vanuit het verleden ( ). Hiertoe zullen we delende cel populaties specifiek labelen met de probes om zo het zoeken naar delende cellen te vereenvoudigen. In het geval we geen delende cellen kunnen vinden binnen de periode van ~6 uur dat we per muis kunnen imageren, kunnen we in ieder geval wel betrouwbaar het aantal aneuploïde cellen meten via de chromosoomtracker die we zullen genereren. Daarnaast zullen we in parallel middels organoid kweek van weefsels uit deze tracker muizen ook kijken naar chromosoomsegregatie in weefselkweek (vervanging). Voor deze imaging zullen we samenwerken met het lab van ( ), een expert op het gebied van intravital imageren. Uiteindelijk zullen we ook binnen onze eigen imaging faciliteit op gaan imageren, waar de faciliteiten ook al geschikt zijn voor intravital imaging van muizen.

### 3.3 Belang

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

Het primaire belang van dit onderzoek is wetenschappelijk. 2 van de 3 kankers zijn aneuploïde. Ondanks dit gegeven, zijn er nog geen therapieën beschikbaar die selectief aneuploïde cellen kunnen bestrijden, terwijl aneuploïdie zo'n belangrijk onderscheidende factor van 'gezonde' lichaamscellen is. Om tot dergelijke therapie te komen, moeten we eerst beter begrijpen hoe cellen en weefsels omgaan met aneuploïdie. Dit doen we waar mogelijk met celkweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celkweek vaak anders op aneuploïdie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploïdie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploïdie in diermodellen te onderzoeken. Onze modellen zijn wereldwijd uniek



en hebben al belangrijke resultaten opgeleverd over aneuploidie en de gevolgen daarvan. In deze experimenten werken we deze bevindingen verder uit en komen we stap voor stap steeds dichterbij mogelijke therapieën die selectief aneuploïde cellen kunnen doden, welke zeer belangrijk kunnen worden in de behandeling van 2 van de 3 kankers, maar mogelijk ook kunnen helpen veroudering beter te begrijpen om uiteindelijk de gevolgen van het ouder worden te kunnen vertragen (healthy ageing), twee zeer belangrijke maatschappelijke belangen. Dit doen we waar mogelijk met celweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celweek vaak anders op aneuploidie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploidie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploidie in diermodellen te onderzoeken.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het overkoepelend doel van deze aanvraag is komen tot manieren om aneuploïde (kanker)cellen selectief te doden. Daartoe moeten we eerst begrijpen wat de gevolgen zijn van aneuploidie in verschillende weefsels en hoe aneuploïde cellen transformeren in kankercellen.

Hiertoe nemen we in parallel een drietal benaderingen:

- 1) We brengen de gevolgen van aneuploidie in niet getransformeerde weefsels (bijv. lever, huid, hersenen, bloed) en tumoren in kaart middels onze bestaande muismodellen voor aneuploïde en nieuw te genereren muismodellen voor aneuploidie (vragen 1 en 2b).
- 2) We onderzoeken welke genen en daarmee samenhangende fysiologische processen van aneuploïde cellen kankercellen maken (middels *in vivo* genetische screens en follow up *in vivo* kandidaat gen validatie (vraag 2)).
- 3) We visualiseren chromosoom(mis)segregatie en aneuploidie door intravital imaging in onze muismodellen voor aneuploidie in vergelijking met imaging van organoid cultures (*in vitro*) om de *in vivo* en *in vitro* gevolgen van chromosomale instabiliteit te kunnen bepalen en vergelijken (vraag 3).

Samenvattend, vergelijken we in deze aanvraag hoe verschillende weefsels reageren op aneuploidie en welke veranderingen de verschillende celtypen moeten doorstaan om kankercellen te worden, omdat ons voorgaand onderzoek heeft aangetoond dat verschillende celtypen verschillend reageren op aneuploidie. Om te komen tot aneuploidie-specifieke therapie, zullen we dus ook moeten weten hoe verschillende weefsels omgaan met aneuploidie. Door in verschillende weefsels de vier beschreven vragen te beantwoorden zullen de komende vijf jaar stappen dichterbij het overkoepelend doel: therapie die selectief aneuploïde kankercellen doodmaakt, therapie die we conceptueel en praktisch zullen testen in een in parallel ingediend projectvoorstel.

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

Het hier beschreven project valt uiteen in de volgende drie hoofdvragen.

1. Wat zijn de gevolgen van aneuploidie voor niet-kankercellen?
2. Wat is de rol van aneuploidie in het ontstaan en de voortgang van kanker?
3. Hoe gedragen aneuploïde cellen zich *in vivo* en *in vitro*?

Deze vragen zullen we beantwoorden middels 3 dierproeftypes:

- Dierproeftype 1: Muismodellen voor aneuploidie in niet getransformeerde cellen.
- Dierproeftype 2: Muismodellen voor aneuploidie in getransformeerde cellen.
- Dierproeftype 3: Muismodellen voor het visualiseren van aneuploidie en chromosoomsegregatie.

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.

In vraag 1 zullen we de gevolgen van aneuploidie in niet getransformeerde cellen onderzoeken. Dit zullen we onder deze vraag doen in diverse weefsels met een focus op niet-kanker gerelateerde pathologie. Een mogelijk gevolg van aneuploidie is versnelde veroudering van weefsels, dit is bijvoorbeeld aangetoond in het werk van [REDACTED]), waarin ze waarnamen dat muizen met systemische (dus in alle organen tegelijk) aneuploidie diverse verouderingsziektes lieten zien, zoals staarvorming, kyphosis, haarverlies, vetverlies. We zullen weefsel-specifiek onderzoeken wat de gevolgen zijn van aneuploidie op bijv. het hematopoïetisch systeem, de lever, de mamma, de hersenen, de darmen en de huid. Indien er aanleiding toe is, breiden we dit met meerdere weefsels uit, in overleg met de IvD. In de meeste gevallen zullen we hiervoor dieren kunnen gebruiken uit onze bestaande foklijnen zonder ongerief. In enkele gevallen zullen lijnen ongerief ondervinden van de weefsel-specifieke aneuploidie. In geval we een tamoxifen-induceerbare Cre hebben, zullen we dieren met tamoxifen moeten behandelen. Deze experimenten zullen inzicht geven hoe niet-getransformeerde cellen (dus zonder kanker-predispositie) reageren op aneuploidie en dus wat de algemene en/of weefsel-specifieke responsen zijn op chromosomale instabiliteit zoals mogelijk versnelde veroudering. Naast dat deze dierproeven inzicht geven in hoe verschillende weefsels omgaan met aneuploidie, dienen de cohorten voor deze vraag ook als controledieren voor de cohorten onder vraag 2b.

Voor vraag 2a zullen we trachten te identificeren welke genen van een aneuploïde cel een kankercel maken. Hiertoe zullen we *in vivo* genetische screens uitvoeren, in eerste instantie met transposons (PiggyBac) en in het hematopoïetisch systeem. In dit muismodel worden transposons conditioneel gemobiliseerd samen met het inactiveren van de genen die de aneuploidie veroorzaken in de gekozen weefsels. De transposons blijven rondspringen gedurende de tumorontwikkeling: deze benadering werkt zeer efficiënt om sterke drivers van tumorigenese bloot te leggen: op die loci blijven de transposons juist behouden [REDACTED]

[REDACTED] Voor deze setup loopt reeds een eerste experiment na een succesvolle pilot vorig jaar als onderdeel van onze huidige vergunning. Gedurende jaar 1-2 van dit voorstel zal deze specifieke screen nog lopen. Als deze screen tot gevalideerde hits leidt (*i.e.* genen die van aneuploïde hematopoïetische stamcellen kankercellen maken) en als we een duidelijke weefsel-specifieke respons op aneuploidie zien onder vraag 1, dan zullen we ook *in vivo* genetische screens uitvoeren in de huid en in het cerebellum. Deze genetische screens zullen we uitvoeren met het [REDACTED]

[REDACTED] Met deze screens zullen we starten zodra daartoe aanleiding is (zie hierboven), waarschijnlijk in jaar 3-5 van dit plan.

Voor vraag 2b zullen we in verschillende weefsels en middels verschillende extra predisposities de rol van aneuploidie in het ontstaan en de voortgang van kanker onderzoeken. Zodoende hopen we inzicht te krijgen in algemene en weefsel-specifieke manieren waarop tumorcellen omgaan met aneuploidie. Onder onze huidige vergunning volgen we een tumormodel voor bloed, een tumormodel voor lever en mammatumormodel. Onder deze CCD aanvraag zullen we nog enkele dieren volgen van deze bestaande lijnen gedurende de eerste twee jaar, daarna zullen de vragen voor deze modellen beantwoord zijn en zullen we de lijnen stoppen.

Daarnaast willen we onder vraag 2b onderzoeken wat de rol van aneuploidie is in het ontstaan van borstkanker, medulloblastoma, darmkanker en huidkanker. Hiertoe zullen we onze bestaande conditionele allelen voor aneuploidie ( ) of nieuw te genereren aneuploidie-inducerende allelen combineren met een chemische of genetische tumorpredispositie. Voor medulloblastoma zullen we cerebellum specifieke ( ) cKO dieren inkruisen met ( ) cKO dieren en/of c-Myc overexpresserende dieren. We verwachten dat dit model de eerste 3 jaar van de aanvraag zal lopen. Voor het induceren van darmtumoren zullen we aneuploidie in de darm combineren met darm-specifieke K-Ras<sup>V12</sup> of ( ) mutatie. Voor huidtumoren zullen we huid specifieke aneuploïde dieren in een Ptch conditionele achtergrond (basal cell carcinoma) of ( ) conditionele achtergrond (squamous cell carcinoma) kruisen of topisch behandelen met TPA en/of DMBA om proliferatie en transformatie te induceren. De darm en huidmodellen zullen we gedurende de laatste 3 jaar van deze aanvraag onderzoeken, maar alleen als uit de voorgaande modellen een duidelijke weefsel specificiteit blijkt van hoe cellen omgaan met aneuploidie. Voor zowel het medulloblastoma-model, het darmmodel en het huidkankermodel zal Cre-recombinase geactiveerd worden met tamoxifen; de foklijnen voor deze dieren bestaan reeds en hebben geen ongerief.

Voor vraag 2c zullen we aneuploïde of controle hematologische tumorcellen sequentieel transplanteren in ontvanger muizen, bepalen hoe snel de cellen opnieuw tumoren vormen en meten hoe de karyotypes van de individuele cellen veranderen. De te transplanteren cellen voor en na transplantatie gemeten worden met single cell sequencing om te karyotype heterogeniteit te meten. In eerste instantie zullen we ons richten op hematologische kankers (Jaar 1-3 van deze aanvraag). Mogelijk breiden we dit naar andere orgaansystemen uit, maar alleen in nauw overleg met de IvD. De experimenten om de groeisnelheid van aneuploïde en niet aneuploïde tumoren te vergelijken zullen gedurende de eerste drie jaar van dit voorstel lopen. In dit voorstel zullen we daarnaast de in onze lopende transposon screen geïdentificeerde genen valideren in follow-up transplantatie experimenten. Hiertoe zullen we (aneuploïde) hematopoïetische stamcellen isoleren en hierin de kandidaatgenen activeren/inactiveren (zoals in de transposonscreen optrad) middels (conditionele) overexpressie of shRNA knockdown/CRISPR/Cas9 om te kijken of dit ook leidt tot transformatie van de aneuploïde hematopoïetische stamcellen. Deze validaties zullen gedurende de gehele duur van dit voorstel lopen.

Voor vraag 3 zullen we nieuwe muismodellen ontwikkelen om mitose, chromosoommissegregatie en aneuploidie in levende dieren te visualiseren in weefsels/celtypes naar keuze. De diermodellen zullen worden gegenereerd op de DEC/CCD vergunning van ( ) en dan ingekruist met onze tumormodellen uit vraag 2 en ontwikkelingsmodellen uit vraag 5. In eerste instantie zullen we ons richten op celdeling en aneuploidie in de huid en tumoren genetisch ( ) of chemisch (DMBA/TPA) induceren dan wel in 'normale' aneuploïde huid naar aneuploidie en celdeling te kijken. Experiment dieren zullen dan geïmaged worden. Hiertoe zullen we gebruik maken van minimaal invasieve imaging windows ( ). Verder zullen we in samenwerking met ( ) organoid cultures generen die we ook zullen imageren. Als we weinig tot geen delende cellen vinden met onze huidige Cre-driver voor de huid, kruisen we onze modellen ook nog in een selectievere Cre-driver die beter delende cellen labelt. Deze experimenten zullen in de eerste 3 jaar van dit voorstel worden uitgevoerd. Als de modellen goed blijken te werken, zullen we ook andere weefsels onderzoeken (bijvoorbeeld mamma, darm, etc.) in samenwerking met labs ( ).

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

| Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 1          | Muismodellen voor aneuploidie in niet getransformeerde cellen.             |
| 2          | Muismodellen voor aneuploidie in getransformeerde cellen                   |
| 3          | Muismodellen voor het visualiseren van aneuploidie en chromosoomsegregatie |
| 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 | De rol van aneuploidie in kanker
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Aneuploidie, kanker, veroudering, intravital imaging

## 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
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid of het welzijn van mens of dier
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Projectbeschrijving

|   |   |
|---|---|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | Aneuploidie is een afwijkende hoeveelheid erfelijk materiaal in de celkern. Aneuploidie is een veelvoorkomende eigenschap van kankercellen; twee van de drie kankers bestaan uit cellen die aneuploïde zijn. Daarmee is een eigenschap waarmee men kankercellen kan onderscheiden van gezonde lichaamscellen. Het specifiek doden van aneuploïde kankercellen zou mogelijk een zeer selectieve manier kunnen zijn om een groot deel van de kankers aan te pakken. Tot dusver is er geen therapie beschikbaar die selectief aneuploïde cellen kan doden. Om tot dit soort van therapie te komen, moeten we eerst beter begrijpen wat aneuploidie met cellen doet. In dit onderzoek brengen we in kaart hoe verschillende weefsels reageren op aneuploidie, hoe aneuploidie in die weefsels tot kanker leidt en welke processen aneuploïde cellen tot kankercellen maken. Hiervoor maken we gebruik van bestaande en nieuw te ontwikkelen muismodellen waarin we aneuploidie op weefselspecifiek niveau kunnen induceren. Zo kunnen we heel specifiek, weefsel voor weefsel, de gevolgen van aneuploïdie voor de ontwikkeling van een weefsel en voor het ontstaan en de voortgang van kanker in kaart brengen. |
| 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?         | Door dit onderzoek zullen we komen tot:<br><ol style="list-style-type: none"><li>1) een beter begrip van hoe verschillende celtypes omgaan met aneuploidie (wetenschappelijk doel)</li><li>2) inzicht in welke processen aneuploïde cellen veranderen in kankercellen (wetenschappelijk doel)</li><li>3) inzicht in welke andere ziektebeelden (mede) een gevolg zijn van aneuploidie (wetenschappelijk doel)</li></ol> Verder zal dit project leiden tot:<br><ol style="list-style-type: none"><li>1) een unieke collectie aneuploïde tumoren in verschillende weefsels (zoals bloed, lever, borst, huid en hersenen) (wetenschappelijk doel)</li><li>2) een unieke aneuploïde weefselcollectie (zoals bloed, lever, borst, huid en hersenen) (wetenschappelijk doel)</li><li>3) muismodellen waarin we aneuploidie onder de microscoop in levende muizen kunnen visualiseren (wetenschappelijk doel)</li><li>4) Alternatieven voor dierproeven (weefselkweek, organoids).</li></ol>   |
| 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?  | Voor ons onderzoek zullen we gebruik maken van overwegend volwassen muizen (7271) en een minderheid embryo's (400) van transgene en wild type muizen  |
| 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?   | Een deel van de dieren zal licht ongerief hebben van injecties of kleine operaties. Een deel van de dieren zal beginnende tumoren ontwikkelen.  |
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?   | ~60% van de dieren zal mild ongerief (injecties, non-invasieve imaging, wegen) hebben; ~37% van de dieren zal matig ongerief hebben (tumoren, invasieve imaging, tumortransplantaties), ~3% zal ernstig ongerief hebben (vorderende of uitgezaaide tumor, opofferen op basis van humane eindpunten).  |
| 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?   | De dieren zullen aan het einde van het experiment gedood worden voor uitgebreide analyse.   |

## 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.

Proefdieren zijn nodig omdat de te onderzoeken processen in een levend organisme moeten plaatsvinden. Al onze experimenten worden vooraf gegaan door uitgebreid weefselkweekonderzoek, waarin we onderzoeken hoe in kweekschaaltjes cellen omgaan met aneuploidie en hoe aneuploide cellen reageren op onze nieuw ontdekte therapieën. Pas als we heel zeker zijn van onze weefselkweekbevindingen, zullen we overgaan tot het testen in muizen, omdat dit het meest geschikte model is om kanker te onderzoeken. Ons voorgaand werk heeft namelijk duidelijk laten zien dat hoe cellen in weefselkweek reageren op aneuploidie niet altijd overeenkomt met hoe cellen in een weefsel reageren. Daarnaast is het tot dusver onmogelijk gebleken om kanker en andere complexe biologische processen betrouwbaar alleen in weefselkweek te modelleren. Uiteindelijk zijn deze proefdiermodellen noodzakelijk voor het vervolgstadium waarbij de nieuwe therapie in klinische studies in de mens verder wordt gevalideerd.

### 4.2 **Vermindering**

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

Voor elk dierexperiment zullen we voorafgaand een statistische analyse uitvoeren om het precies aantal benodigde dieren te berekenen. In gevallen waarbij we niet perfect het aantal benodigde dieren van tevoren weten (bijvoorbeeld als we een nog onbekend biologisch proces bestuderen), zullen we altijd eerst een kleine groep dieren testen (pilot cohort, gebaseerd op jarenlange ervaring) om te komen tot de correcte complete groepsgrootte. Tenslotte houden we ons via literatuur en ons professionele netwerk op de hoogte van het werk van onze collega's om duplicatie van dierexperimenten te voorkomen. Op deze wijze dragen we er zorg voor dat we een minimum aantal proefdieren nodig zullen hebben en dat ongerief tot een minimum beperkt blijft.

### 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 muis is het meest geschikte model voor dit type onderzoek gezien de kennis, hulpmiddelen en technieken die beschikbaar zijn voor kankeronderzoek in de muis. We onderzoeken de effecten van aneuploidie met name in weefsels waar muizen er relatief weinig last van ondervinden en beëindigen experimenten voordat muizen ernstig ongerief ondervinden.

Vermeld welke algemene maatregelen genomen

Tumoren zullen in eerste instantie optreden in het weefsel waarin we de aneuploidie geïnduceerd hebben. Deze weefsels zullen uitgebreid gemonitord worden. Door onze ruime ervaring en de ruime ervaring van onze dierversorgers zullen dieren

worden om de negatieve (schadelijke) gevolgen voor het welzijn van de proefdieren zo beperkt mogelijk te houden.

opgeofferd worden bij de eerste symptomen van ongerief. Op deze wijze zullen we het ongerief tot een minimum beperken. Dieren zullen daarom zeer regelmatig geïnspecteerd worden om ongerief zo vroeg mogelijk te zien. Dieren zullen worden verdoofd waar nodig (bijvoorbeeld bij intravital imaging). Door op weefselniveau te kijken naar aneuploidie wordt eventueel ongerief beperkt tot 1 orgaansysteem. Bovendien ligt het focus op orgaansystemen waarin tumoren relatief weinig ongerief/pijn geven (bloed, lever, huid, cerebellum) en zal onze kennis van de modellen eraan bijdragen dat de dieren worden opgeofferd voordat ze ongerief zullen ondervinden van de tumoren.

## 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          | Muismodellen voor aneuploidie in niet getransformeerde cellen |

*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.

In dit type dierproef zullen we in verschillende weefsels van de muis (bijv. huid, lever, brein, bloed, darm of mamma) aneuploidie veroorzaken en de gevolgen (zoals mogelijk versnelde veroudering) voor de weefsels onderzoeken. We zullen aneuploidie veroorzaken met behulp van onze eerder gepubliceerde conditionele allelen ■■■■ of ■■■■ of door nieuwe te genereren drivers van aneuploidie. Om de aneuploidie weefselspecifiek te provoceren, zullen onze conditionele knockout allelen gecombineerd worden met weefselspecifieke Cre-drivers voor bijvoorbeeld de huid, het cerebellum, het bloed, de darm en de mamma. Cohorten van dieren zullen dan gevolgd worden gedurende enkele weken tot maximaal 18 maanden met een focus op aneuploidie-geïnduceerde pathologieën (veroudering, neurodegeneratie, stamceldepletie). Tussentijds zullen op geplande momenten dieren opgeofferd worden voor

uitgebreide moleculaire analyse en pathologie. In een klein deel van de gevallen zullen ontvanger muizen aneuploïde cellen (bijv. hematopoïetische stamcellen, HSCs) getransplanteerd krijgen om hun regeneratieve capaciteit te meten middels lineage tracing. Daarnaast zal een deel van de dieren een fluorescent reporter gen tot expressie brengen wat ons helpt om aneuploïde cellen te isoleren of volgen. Tenslotte zullen we een klein aantal dieren opofferen voor primaire celkweek doeleinden (vermindering en vervanging), zodat we een deel van onze experimenten met weefselkweek kunnen uitvoeren.

In deze dieren zullen we verschillende uitkomst parameters meten/bepalen.

Om te valideren dat de dieren inderdaad aneuploidie accumuleren in de getargete weefsels zullen we deze weefsels onderwerpen aan karyotypering middels single cell sequencen, metaphase spreads en interphase FISH. Dit gebeurt op ingevroren of gefixeerde cellen. Daarnaast zullen we de weefsels onderwerpen aan een histologische analyse, waar noodzakelijk gecombineerd met immunohistochemie (ingevroren en gefixeerde weefsels). Verder zullen we de respons op aneuploidie meten middels transcriptome analyse (RNA sequencing, qPCR) en middels biochemische bepalingen (Western Blots, en mogelijk mass spectrometrie op een select aantal samples (ingevroren weefsels). Tenslotte zullen we cellijnen afleiden uit diverse weefsels om verder celbiologische metingen te kunnen doen aan de aneuploïde weefsels (time-lapse microscopie, mechanistische experimenten, etc) (vers ingevroren weefsels in kweekmedium en vers in kweek genomen weefsels).

---

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.

In eerste instantie zullen de Cre-positieve lijnen worden gegeneerd (fok). Omdat bij deze fok nieuwe allelen worden gecombineerd, kunnen we niet met 100% zekerheid voorspellen of de nieuwe lijnen ongerief hebben. De eerste twee generaties van deze nieuwe lijnen gelden dus als fok met ongerief (zie ook aantallen dieren). De meerderheid van de dieren zullen geen verdere behandelingen ondergaan, dieren zullen alleen nauwlettend gevolgd worden op het ontstaan van pathologie op worden opgeofferd op diverse leeftijden. In een deel van de cohorten (wanneer we gebruik maken van induceerbare Cre-drivers) zullen dieren tamoxifen of PolyI/PolyC toegediend krijgen om Cre te induceren. Tamoxifen toediening zal plaatsvinden via orale toediening, IP injecties of in geval van netgeboren pups via injectie direct door de maagwand. PolyI/PolyC wordt IP toegediend. Dieren worden 4-5 keer behandeld binnen een periode van 2 weken. Deze toedieningsmethodieken zijn gebaseerd op onze eigen bestaande protocollen en noodzakelijk om voldoende Cre-activiteit te waarborgen. In geval de dieren een fluorescent reporter gen tot expressie brengen, zullen we in enkele gevallen de dieren imageren met een IVIS imaging station. Hiervoor worden de dieren licht gesedeerd en gedurende enkele minuten in het imaging station gelegd. De dieren worden dan teruggelegd in hun kooi om ze te laten bijkomen. Uiteindelijk zullen de dieren op verschillende tijden worden opgeofferd (cervicale dislocatie na isofluraan sedatie) om de diverse relevante weefsels te isoleren voor pathologie en moleculaire analyses, of, in enkele gevallen, voor HSC transplantaties.

---

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

In de meeste gevallen kennen we de latentie van de fenotypes/pathologie van de voren niet. Onze uitgebreide ervaring heeft ons geleerd, dat cohorten van 40-50 dieren per genotype in totaal voldoende zijn om een statistisch significant verschil aan te tonen tussen controle-groepen en dieren met een genetische predispositie (aneuploidie). In het geval van dit type dierproef zullen we controle en experimentdieren op verschillende leeftijden opofferen: hiervoor kiezen we ongeveer 5 tijdspunten gelegen tussen kort na geboorte en 18 maanden.

Om tot het minimum aantal noodzakelijke dieren te kunnen komen, zullen we daarom altijd starten met een pilotcohort van dieren (ongeveer 15 per groep, 3 per tijdspunt): dit geldt dus voor alle hieronder 'B aangevraagde dieraantallen' beschreven groepen. Deze dieren zullen dan worden geanalyseerd middels de hierboven beschreven uitleesparameters en dan zal er gekeken worden of we op basis van dit aantal dieren (en geïsoleerde weefsels) voldoende verschillen hebben kunnen waarnemen. Dan vindt een go/no go assessment plaats (zijn er verschillen waarneembaar op basis van de beschreven uitleesparameters?) en zo ja, dan zullen we in overleg met de IvD de groepsgrootte uitbreiden tot MAXIMAAL 50 dieren (10 per tijdspunt), afhankelijk van hoe groot de verschillen

zijn tussen de experimentgroep en controlegroep en op welke tijdstippen de verschillen waarneembaar zijn. In de meeste gevallen verwachten we dat we per groep minder dieren zullen nodig hebben. Als er op een bepaald tijdstip geen verschillen waarneembaar zijn na de assessment van de eerste 15 dieren, dan zullen we dit tijdstip niet verder onderzoeken en als er helemaal geen verschillen meetbaar zijn, dan zullen we concluderen dat de aneuploidie in deze setting geen effect heeft en geen extra dieren gebruiken (het blijft dan bij de eerste 15 gebruikte dieren).

Bij doorgang zullen na afronding van de experimenten en followup analyses alle dieren (dus pilot van 15 en extra aangevraagde dieren tot een maximum van 50 in totaal) als 1 experimentgroep beschouwd worden. Correctie voor multiple testing is dan ook niet noodzakelijk. De eerste 15 dieren als pilot: we gaan ervan uit (op basis van voorgaande kennis) dat 15 dieren niet voldoende is om een significant verschil tussen dieren aan te tonen. Omdat de genotypes die we testen een onbekend fenotype hebben, kunnen we niet 100% voorspellen wat de verschillen in fenotype tussen de dieren zullen zijn. Mocht dit verschil groter zijn dan hier ingeschat, dan zullen we post-hoc een nieuwe power analyse uitvoeren met de dan nieuw bekende gegevens (i.e. het verschil in overleving tussen de groepen en de verdeling van experimentwaardes) om zo vast te stellen of de 15 dieren voldoende zijn voor een statistisch significant verschil of dat er nog meerdere dieren noodzakelijk zijn.

In geval van HSC transplantaties zijn 25 dieren per groep in onze ervaring voldoende.

Belangrijk: ook beschouwd vanuit een power-analyse is 40-50 dieren per cohort een reële schatting: in ons geval is de variatiecoëfficiënt sigma vooraf niet bekend; de proefgrootte wordt daarom afgelezen van een uit Owen afgeleide grafiek (Proefdieren en Dierproeven, L.F.M van Zutphen, vijfde druk, 2009, blz 211). Op basis van een onbetrouwbaarheidsdrempel (alpha) van 0.05 of een power (pi) van  $> 0.8$  en een verhouding tussen het te meten verschil ( $\mu_1 - \mu_2 / \sigma$ ) en variatiecoëfficiënt van ongeveer 0.7 (dit betekent dat er bij een spreiding sigma van bijvoorbeeld 2 maanden in de overleving binnen 1 groep een significant verschil gemeten wordt als de gemiddelde overleving tussen experiment en controlegroep 1.5 maanden uit elkaar ligt; dit zijn reële waarden die we in de praktijk vaak waarnemen) valt er uit de grafiek af te lezen dat de proefgrootte ongeveer 40-50 dieren dient te zijn.

---

## **B. De dieren**

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

Alle experimenten zullen worden uitgevoerd op transgene muizen. We maken gebruik van zowel mannen als vrouwen behalve in geval van de mamma-experimenten (daar gebruiken we alleen vrouwen), omdat er geen reden is om aan te nemen dat we verschillen zullen zien tussen de sexes. Voor dit type dierproef zullen alleen volwassen muizen uit eigen fok (heel soms bestellen we dieren vanuit extern, zoals ██████████) gebruikt worden, in sommige gevallen zullen dieren als jong volwassene al behandeld worden op Cre te activeren. Binnen dit type dierproef zullen we de volgende experimentele en controle cohorten volgen:

Aneuploidie in bloed:

1 experimenteel en 1 control cohort voor aneuploïdie in T-cellen:  $50+50 = 100$  dieren

1 experimenteel en 1 controle cohort voor aneuploïdie in het hematopoïetisch systeem:  $50+50 = 100$  dieren

1 experimenteel en 1 controle cohort voor transplantaties van aneuploïde cellen in het hematopoïetisch systeem:  $50+50$  donor dieren +  $100$  recipient dieren =  $200$  dieren

Subtotaal 400 dieren

Aneuploidie in de kleine hersenen:

1 experimenteel en 1 controle cohort voor induceerbare aneuploidie in de kleine hersenen:  $50+50 = 100$  dieren

Subtotaal 100 dieren

Aneuploidie in de huid en darm:

1 experimenteel en 1 controle cohort voor induceerbare aneuploidie in de epidermis:  $50+50 = 100$  dieren

1 experimenteel en 1 controle cohort voor induceerbare aneuploidie in de darm:  $50+50 = 100$  dieren

1 experimenteel en 1 controle cohort voor induceerbare aneuploidie in de stamcellen van de darm en huid:  $50+50 = 100$  dieren

Subtotaal 300 dieren

Aneuploidie in de lever:

1 experimenteel en 1 controle cohort voor aneuploidie in de lever:  $50+50 = 100$  dieren

Subtotaal 100 dieren

Aneuploidie in de mamma:

1 experimenteel en 1 controle cohort voor aneuploidie in mamma epitheel:  $50+50 = 100$  dieren

Daarnaast genereren we ook enkele nieuwe modellen voor chromosomale instabiliteit, die we in eerste instantie zullen testen in het bloed en de huid. Omdat we deze kandidaatgenen nog in celkweek aan het testen zijn, weten we de gennamen hiervan nog niet. We verwachten de komende 5 jaar ongeveer 4 van deze modellen te genereren waarvan we de gevolgen willen bekijken in 2 weefsels (dus 8 stammen), waarvoor we per cohort maximaal 50 dieren zullen volgen. Voor de controle cohorten voor bloed en huid zijn hierboven al dieren aangevraagd.

Subtotaal nieuw te testen genen: 400 dieren

Ook zullen we vanuit een deel van deze verschillende modellen primaire cellen isoleren (vervanging en vermindering van dierproeven)

Hiervoor vragen we de volgende hoeveelheid dieren aan:

Ten bate van primaire keratinocyten: 20 dieren

Ten bate van mouse embryonic stem cells: 20 dieren (moeders; embryo's zijn pas op E3.5 en tellen nog niet als proefdier)

Ten bate van mouse embryonic fibroblasts (40 dieren en 400 E13.5 embryo's)

Ten bate van darm organoids: 20 dieren

Ten bate van mamma organoids 20 dieren

Subtotaal primaire kweek: 120 dieren en 400 embryo's.

Voor deze experimenten zullen we een aantal nieuwe muizenstammen genereren. We verwachten geen ongerief in de fok van deze dieren, maar omdat we dit van te voren niet kunnen uitsluiten gelden de eerste twee generaties als fok met ongerief. Per genotype zetten we over het algemeen twee fokparen in, die we elk twee nestjes laten krijgen. Hiermee is een voldoende aantal dieren te krijgen om de juiste genotypes af te leiden en krijgen we voldoende dieren om met grote zekerheid vast te stellen dat de nakomelingen geen ongerief ondervinden. Per nieuw te genereren stam vragen we daarom 4 nesten (2 nesten per genotype, 2 generaties) nakomelingen met gemiddeld 12 pups, dus 48 dieren aan. Voor de hierboven beschreven cohorten zullen we 17 nieuwe genotypes genereren.

Subtotaal fok met ongerief:  $17 \times 48 = 816$  dieren.

Het totaal aantal dieren voor dit type dierproef komt daarmee op 2336 volwassen dieren en 400 embryo's

### 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.

Waar mogelijk doen we onze experimenten met celkweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celkweek vaak anders op aneuploidie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploidie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploidie in diermodellen te onderzoeken.

We hebben het minimum mogelijk aantal dieren per groep gekozen (vermindering) en starten in alle gevallen met een klein pilotcohort om te bepalen of er meetbare verschillen tussen experiment en controledieren zijn. Daarnaast dienen de experimentdieren in dit dierproeftype als controlecohorten voor de tumorproeven onder dierproeftype 2. Daarnaast gebruiken we de experimentdieren om te leren wat de gevolgen van aneuploidie zijn in een niet getransformeerde setting. Op deze wijze beantwoorden we twee vragen met deze cohorten en verminderen we het totaal aantal benodigde dieren.

We hebben zoveel mogelijk gekozen voor weefsels waar afwijkingen relatief weinig ongerief opleveren als verfijning. Bovendien kiezen we voor een deel van de experimenten voor een weefselkweek benadering (vermindering, vervanging) en proberen meerdere dingen van dezelfde dieren te leren (bijvoorbeeld fenotypes voor stamcellen in de darm en huid kunnen we in 1 experiment tegelijk onderzoeken). Tenslotte maken we waar mogelijk gebruik van tussentijdse non-invasieve metingen in de lineage tracing experimenten (vermindering, verfijning) zodat hetzelfde dier meerder malen gemeten kan worden wat leidt tot vermindering van het totaal aantal benodigde dieren.

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

Aangezien onze voorgaande kennis uitwijst dat aneuploïde verbazingwekkend goed getolereerd wordt in vivo, verwachten we weinig tot geen ongerief in dit type dierproef. Alle dieren in experiment zullen intensief gecontroleerd worden (dagelijkse controle door dierversorgung en minimaal 2 maal per week

intensievere controle door de onderzoekers) om uit te sluiten dat de dieren ongerief ondervinden.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

Deze proeven zijn nog niet eerder uitgevoerd. Hiervoor hebben we een uitgebreide zoekopdracht op PubMed uitgevoerd en daarnaast gesproken met onze diverse collega's die dit soort modellen ontwikkelen [REDACTED]

## 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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er wordt weining ongerief verwacht. Het is mogelijk dat aneuploidie in het cerebellum tot milde motorische afwijkingen leidt ten gevolge van neurodegeneratie. Verder kunnen in andere weefsels andere weefsel-specifieke verouderingspathologieën optreden, zoals stamceldepletie, senescence, wat uiteindelijk (in de latere tijdstippen) tot verminderde weefselfunctionaliteit zal leiden. Zo is het mogelijk dat aneuploidie in de darm tot villi-degeneratie leidt en daarmee tot gewichtsverlies. In de laatste tijdstippen (dieren ouder dan een jaar) zullen dieren ook 'natuurlijk' verouderen. Dit kan leiden tot de bij muis bekende verouderingsaandoeningen zoals tumoren, blindheid, prolapsen, huidaandoeningen. We zullen hier de dieren niet langer dan 18 maanden houden om extreme veroudering te voorkomen.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Mogelijk is er milde neuronale degeneratie in het cerebellum model. In de darm kan aneuploidie leiden tot depletie van stamcellen en daarmee villi degeneratie. In de andere modellen verwachten we geen pathologie die direct tot ongerief zal leiden, maar dit zal nauwlettend in de gaten gehouden worden. Bij de dieren ouder dan een jaar kunnen aandoeningen ook ontstaan door natuurlijke veroudering.

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

Dieren zullen zeer regelmatig (minimaal 2 maal per week) uitgebreid geïnspecteerd worden door de verantwoordelijk onderzoeker en dagelijks door de diervoorzorg om ongerief te voorkomen. In geval van ernstig ongerief door neurodegeneratie of villi-degeneratie zal of de dosis van tamoxifen verlaagd worden (noodzakelijk om de knockout genen te inactiveren) om zo mozaïsche aneuploidie te provoceren (en daarmee een milder fenotype). Doordat de aneuploïde cellen bij deze weefsels ook een fluorescente reporter tot expressie brengen, kunnen we de aneuploïde cellen alsnog isoleren uit de weefsels.

### **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 de minderheid van de gevallen zullen dieren dusdanig ernstig ziek worden dat de op basis van humane eindpunten opgeofferd dienen te worden. Onze ervaring met voorgaande modellen leert dat deze aantallen kleiner dan 5% van de dieren betreft. In dit dierproeftype zal dit naar verwachting alleen optreden als de dieren ernstig gevochten hebben, aangezien we geen ernstige pathologie verwachten met aneuploidie alleen. De te verwachten fenotypes (neurodegeneratie, villidegeneratie) zullen we nauwlettend van dag tot dag volgen, zodat deze dieren nooit dusdanig ernstig ongerief hebben dat ze moeten worden opgeofferd op basis van humane eindpunten maar altijd ruim voor die tijd. De algemene criteria die wij hanteren om dieren op basis van humane eindpunten op te offeren zijn als de dieren moribund zijn, lethargisch zijn, >20% van hun gewicht verloren zijn, ernstige neurologische afwijkingen laten zien (balansproblemen), ernstige verouderingsafwijkingen laten zien (spontane tumoren, prolapsen, ernstige huidaandoeningen) of ernstige (vecht)wonden hebben.

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

We verwachten voor deze proef dat minder dan 2% van de dieren op basis van humane eindpunten opgeofferd dienen te worden.

---

**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 cumulatief ongerief schatten we in als licht.

---

### 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.

Dieren zullen uitgebreid worden onderzocht op macroscopische pathologie en weefels zullen worden opgestuurd voor histologie. Verder zullen aangedane organen worden opgeslagen voor verder onderzoek (eiwit, RNA, DNA, aneuploidie metingen) zoals beschreven onder uitleesparameters.

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.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  |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="2"/> | <input type="text" value="Muismodellen voor aneuploidie in getransformeerde cellen"/> |

*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.

In dit type dierproef onderzoeken we de relatie tussen chromosomale instabiliteit en kanker. Ons voorgaand onderzoek heeft uitgewezen dat chromosomale instabiliteit in de levensduur van een muis niet voldoende is om reproduceerbaar tot kanker te leiden (zie ook dierproeftype 1). Om beter te begrijpen hoe aneuploidie tot kanker leidt en hoe deze aneuploide kankers zich gedragen zullen we a) zoeken naar genen die samen met aneuploidie leiden tot kanker (middels genetische mutagenese (transposons, CRISPR)); zullen we b) onze bekende of nieuwe drivers voor chromosomale instabiliteit combineren met bekende tumorpre-disposities (bijv. ██████, Ptch, Myc, Ras) of chemische mutagenese om aneuploide tumoren in diverse weefsels te veroorzaken; en c) humane en muizekankers transplanteren in de muis om te vergelijken hoe snel aneuploide en nieuw-aneuploide tumoren groeien en hoe frequent deze tumoren

chromosomen missgegregeren.

Voor deelvraag a) zullen we een genetische in vivo screens uitvoeren (transposon of CRISPR) in enkele weefsels (bloed; kleine hersenen, darm en huid). Hiertoe zullen we onze conditionele knockout muizen inkruisen in een conditionele transposon of conditionele CRISPR achtergrond. Het genoom van het te targetten aneuploide weefsel zal dan worden gemutageniseerd (door transposons of CRISPR-libraries) en dieren zullen dan worden gevolgd op het ontstaan van tumoren. Zodra dieren ziek worden, zullen ze worden opgeofferd en de ontstane tumoren zullen worden geanalyseerd op driver-mutaties in de tumoren. We zullen beginnen met een eerste screen in bloed (pilot screen hiervan is al uitgevoerd onder oude vergunning) en daarin bepalen welk deel van de hits (genen die aneuploide bloedcellen veranderen in leukemiecellen) specifiek zijn voor bloedcellen en welke meer een algemene rol hebben in de celbiologie. Als er een groot deel van de significante hits weefselspecifiek zijn (dat is de verwachting), dan zullen we de transposonscreen uitbreiden naar andere weefsels (Go). We zullen die uitbreiding weefsel voor weefsel doen, waarbij we altijd eerst een pilotscreen zullen uitvoeren zoals hieronder beschreven. Mocht onze eerste transposonscreen met name 'algemene hits' opleveren, en het daarom aannemelijk is dat we geen extra hits zouden vinden in andere weefsels, dan beperken we ons tot 1 transposonscreen (No-Go).

Voor deelvraag b) zullen we ontstane tumoren in de verschillende modellen onderling vergelijken om de weefselspecifieke en algemene respons tegen aneuploidie in kaart te brengen. Onze eerste aanwijzingen uit voorgaand onderzoek laten zien dat er grote verschillen zijn tussen hoe verschillende weefsels/tumortypes reguleren op aneuploidie. Daarom willen we dit nu voor meerder weefsels goed in kaart brengen. In eerste instantie zullen we ons richten op bloed, lever, huid, (kleine) hersenen, darm en borst. ■■■■ (en in sommige gevallen ook ■■■■ of nieuw te genereren conditionele allelen voor chromosomale instabiliteit zullen in een tumorpredispositieachtergrond gekruisd worden (bijv. ■■■■ (huid, bloed, lever), Ptch1 (huid, cerebellum), Myc (cerebellum), mutant Ras (huid, darm), APC (darm), Her2 (mamma). Per weefsel zullen we 1 of enkele cohorten van dieren opzetten en volgen op het ontstaan van tumoren. Dieren zullen nauwlettend worden gevolgd (minimaal 2 maal per week) op het ontstaan van tumoren door veranderingen in gedrag en gewicht te monitoren, en/of uiterlijke veranderingen zoals zichtbare (huid) of palpeerbare (mamma) tumoren. In geval van de huid zullen we ook in een cohort dieren tumoren chemisch induceren (DMBA, TPA). Dieren zullen worden opgeofferd bij de eerste tekenen van tumoren om ongerief tot een minimum te beperken. Voor deze experimenten zullen eerst 15 dieren worden ingezet als pilot en als er meetbare verschillen zijn (Go), zal dit worden uitgebreid tot maximaal 50 dieren per cohort, zo niet, dan zal dit cohort niet verder opgevolgd worden (No-Go)

Voor deelvraag c) zullen dieren (tumor)cellen ingespoten krijgen om de groeisnelheid van de cellen in vivo te bepalen, om te kijken of de cellen zich gedragen als 'echte kankercellen' en om te bepalen hoe vaak de cellen chromosomen missegregeren. In de meerderheid van de experimenten zullen dieren hematologische (tumor)cellen ingespoten krijgen in het bloed en zal gevolgd worden of deze tumoren gaan groeien in de muis. In enkele gevallen zullen muizen subcutaan tumorcellen ingespoten krijgen om te kijken of cellen maligne zijn. In dit geval zullen de muizen onderhuidse tumoren ontwikkelen.

In de dieren zullen we verschillende uitkomst parameters meten/bepalen.

De allereerste belangrijke uitkomstparameter voor dit dierproeftype is tumorlatentie en/of tumorgrootte. Waar mogelijk meten we dit met non-invasieve imaging (fluorescent gelabelde tumoren te meten middels IVIS imager)

Daarnaast zullen we in de transposon-geïnduceerde tumoren meten waar de transposons geïntegreerd zijn (middels sequencing) om te kijken hoe de aneuploide cellen veranderd zijn in kankercellen.

Om te valideren dat de dieren inderdaad aneuploidie accumuleren in de getargete weefsels zullen we deze ontstane tumoren onderwerpen aan karyotypering middels single cell sequencing, metaphase spreads en interphase FISH. Dit gebeurt op ingevroren of gefixeerde tumorcellen.

Daarnaast zullen we de tumoren onderwerpen aan een uitgebreide histologische analyse, waar noodzakelijk gecombineerd met immunohistochemie

(ingevroren en gefixeerde weefsels). Verder zullen we de respons op aneuploidie meten middels transcriptome analyse (RNA sequencing, qPCR) en middels biochemische bepalingen (Western Blots, en mogelijk mass spectrometrie op een select aantal samples (ingevroren weefsels). Tenslotte zullen we cellijnen afleiden uit diverse tumoren om verder celbiologische metingen te kunnen doen aan de tumorcellen (time-lapse microscopie, mechanistische experimenten, etc) (vers ingevroren tumoren in kweekmedium en vers in kweek genomen tumoren).

---

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.

Voor deelvraag a) zullen we conditioneel aneuploide muizen kruisen met stammen waarin induceerbaar transposons gemobiliseerd kunnen worden. Cre zal dan met tamoxifen geïnduceerd worden (oraal of IP, 4-5 behandelingen binnen 2 weken, of IP PolyI/PolyC, 4-5 behandelingen om de dag) waarbij het te targetten weefsel aneuploide wordt en tegelijkertijd de transposons zullen mobiliseren. Dieren zullen dan gevolgd worden op het ontstaan van tumoren. We hebben al een succesvolle pilotscreen lopen voor bloed en willen nu ook screenen in de huid en het cerebellum om weefselspecifieke drivers van aneuploide kankers in deze weefsels bloot te leggen.

Omdat we de tumorlatentie niet kennen, zullen we eerst pilotcohorts van ongeveer 15 dieren volgen, om te bepalen of de transposons in het te bestuderen weefsel in combinatie met aneuploidie leidt tot tumoren. Als dit het geval is (validatie pilot, Go), dan zullen we in overleg met de IvD een compleet cohort inzetten van 100 dieren totaal (85 extra dieren, waarbij de 15 pilot dieren het cohort compleet maken). Mocht de pilot uitwijzen dat de dieren geen of te weinig tumoren krijgen om genetische drivers van aneuploide kanker te vinden, dan zullen we de proef voor het betreffende weefsel niet uitbreiden naar een compleet cohort (No-Go).

Als een pilot voor een ander type genetische screen zullen we onze conditionele aneuploide muizen inkruisen met de conditionele CRISPR muis (Platt et al Cell. 2014;159(2):440-55). Dieren zullen dan viraal CRISPR-guideRNA libraries toegediend krijgen en gevolgd op het ontstaan van tumoren. Omdat deze technologie nog zeer jong is, zullen we hiervoor eerst 2 kleine pilots uitvoeren, 1 in hersenen en 1 in de mamma. Als dit type screen in de pilots succesvol is (de dieren ontwikkelen reproduceerbare tumoren), dan zullen we een van deze twee weefsels kiezen (met de kortste tumor latentie of minste ongerief) voor een complete screen (Go). In de pilots zullen dieren intraveneus lentiviraal virus toegediend krijgen coderend voor de guideRNAs volgens de geldende protocollen in de literatuur.

Voor deelvraag b) zullen dieren in een deel van de cohorten geen behandelingen ondergaan, dieren zullen alleen nauwlettend gevolgd worden op het ontstaan van de genetisch geïnduceerde tumoren. In een ander deel (wanneer we gebruik maken van induceerbare Cre-drivers) zullen dieren tamoxifen of PolyI/PolyC toegediend krijgen om Cre te induceren. Dieren zullen dan nauwlettend gevolgd worden op het ontstaan van tumoren. Een deel van de tamoxifen behandelde dieren (het cohort waarin we kanker in de huid bestuderen) zal naast met tamoxifen ook met TPA/DMBA (chemische carcinogenese) behandeld worden, DMBA behandeling is eenmalig, TPA behandeling is daarna wekelijks tot er tumoren ontstaan. Dieren zullen regelmatig worden geschoren om topische toediening te faciliteren. Tijdens de behandeling zullen deze laatstgenoemde dieren nauwlettend gevolgd worden op het ontstaan van huidtumoren. Ook voor deze experimenten zullen we in eerste instantie 15 dieren per cohort inzetten als pilotcohort, waarna we bepalen of er verschillen waarneembaar zijn tussen experiment en controledieren. Zo ja (Go), dan zullen we hiervan een compleet cohort maken door maximaal 35 extra dieren in te zetten (dus 50 in totaal). Als er in de pilot geen of te kleine verschillen zijn tussen de groepen, zullen we geen extra dieren gebruiken voor het betreffende pilotcohort (No-Go).

Voor deelvraag c) zullen we om de groeisnelheid van aneuploide tumoren te vergelijken met niet aneuploide tumoren muizen injecteren met aneuploide kankercellen of niet aneuploide kankercellen. Hiervoor zullen we aneuploide en niet aneuploide tumorcellen isoleren uit onze muismodellen voor T-ALL. Deze tumorcellen zullen we labelen met een genetische fluorescente reporter om ze in vivo te kunnen traceren met de IVIS imager. Op deze wijze kunnen we volgen of de donor dieren tumoren ontwikkelen. Dieren worden opgeofferd als we een tumor waarnemen (IVIS) en tumorcellen worden dan getransplanteerd in ontvanger dieren, zodat we de groeisnelheid (het ontstaan van de tumor in de recipient) kunnen vergelijken tussen aneuploide en niet aneuploide tumoren. We zullen deze methode eerst testen op een pilotcohort van 15 dieren en indien we de groeisnelheid betrouwbaar kunnen meten, dan zullen we het cohort uitbreiden tot MAXIMAAL 50 dieren of tot het aantal dieren waarbij we significante verschillen hebben gemeten tussen de experiment en controle dieren. Indien we voorzien dat we geen significante verschillen kunnen meten in een cohort van 50 dieren, dan beschouwen we het verschil als biologisch niet significant en zullen we niet meer dieren dan de pilot gebruiken (15, No-Go).

Daarnaast zullen we kandidaatgenen die samen met aneuploidie leiden tot hematologische kankers (te vinden in de onder a beschreven transposonscreen in bloed) valideren middels transplantaties van aneuploidie bloedcellen die retroviraal/lentiviraal getransduceerd zijn met kandidaatgen cDNAs of RNAis. Deze experimenten zullen dus pas plaatsvinden (Go) als we kandidaatgenen uit de transposonscreens geïdentificeerd hebben en niet worden uitgevoerd als geen van de transposonscreens werkt (No-Go). Voor de in vivo validatie van kandidaatgenen worden longterm en shortterm hematopoïetische stamcellen uit onze conditionele knockuit muizen geïsoleerd (te verkrijgen via dierproeftype 1). Deze cellen worden in kweek getransduceerd met kandidaatgenen (maximaal 5 transplantaties per gen) en Cre-reporter en daarna in immuno-compromised ontvangermuizen getransplanteerd. Dieren (maximaal 5 per te testen gen, zie ook onder motivering dieraantallen) worden dan gevolgd op de ontwikkeling van maligniteiten.

Verder zullen we kandidaatgenen valideren gevonden in de transposonscreens die leiden tot solide tumoren (darm, huid, hersenen). Aangezien dit solide tumoren zijn, zullen deze kandidaatgenen in hechtende relevante cellijnen getransduceerd worden (cDNA/RNAi, CRISPR) en subcutaan geïnjecteerd worden. Dieren worden dan gevolgd voor de vorming van subcutane tumoren (1 flank experiment, 1 flank controle) en opgeofferd als de tumoren >1 cm worden. Ook hier zullen we maximaal 5 dieren per te valideren gen gebruiken.

Tenslotte zullen we een aantal dieren gebruiken om de genomische instabiliteit en/ of frequentie van chromosoommissegregatie in getransplanteerde tumoren te quantificeren. Primaire tumorcellen zullen hiertoe worden getransplanteerd in immuno-compromised hosts. Muizen worden dan gevolgd op de ontwikkeling van maligniteiten (bloed of subcutaan) en opgeofferd om te meten hoe heterogeen de tumoren zijn. Per te analyseren tumor zullen we maximaal 5 dieren met de primaire tumor transplanteren.

---

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

In de meeste gevallen kennen we de latentie van de fenotypes/pathologie van de voren niet. Onze uitgebreide ervaring heeft ons geleerd, dat cohorten van 40-50 dieren per genotype voldoende zijn om een statistisch significant verschil aan te tonen tussen controle-groepen en dieren met een genetische predispositie (aneuploidie). In sommige gevallen blijken te verschillen tussen controlegroepen en experimentgroepen zo groot dat een kleiner aantal dieren volstaan had om het verschil in overleving/tumorlatentie significant aan te tonen. Om tot het minimum aantal noodzakelijke dieren te kunnen komen, zullen we daarom altijd starten met een pilotcohort van dieren (15 per groep) en deze alleen uitbreiden tot 50 dieren als er meetbare verschillen zijn tussen experiment en controledieren (Go) na overleg met de IvD. Als we geen duidelijk verschillen in een van de pilotcohorten meten zullen we het betreffende

---

cohort niet uitbreiden (no-Go) en concluderen dat er geen significante biologische verschillen meetbaar zijn.

In geval het volledige cohort van 50 dieren noodzakelijk is om de een significant verschil te meten zullen alle dieren (dus pilot van 15 en 35 extra dieren) als 1 experimentgroep beschouwd worden. Correctie voor multiple testing is dan ook niet noodzakelijk. Belangrijk hiervoor is wel, dat omdat alle experimenten survival curves zijn, we weinig variatie in de overleving verwachten tussen de pilot en eventueel noodzakelijke uitgebreidere cohorten. In eerste instantie dienen de eerste 15 dieren echt als pilot: we gaan ervan uit (op basis van voorgaande kennis) dat 15 dieren niet voldoende is om een significant verschil tussen dieren aan te tonen. Omdat de genotypes die we testen een onbekend fenotype hebben, kunnen we niet 100% voorspellen wat het verschil in overleving zal zijn. Mocht dit verschil groter zijn dan hier ingeschat, dan zullen we post-hoc een nieuwe power analyse uitvoeren met de dan nieuw bekende gegevens (i.e. het verschil in overleving tussen de groepen en de verdeling van experimentwaardes) om zo vast te stellen of de 15 dieren voldoende zijn voor een statistisch significant verschil of dat er nog meerdere dieren noodzakelijk zijn.

In geval van transposon screens zullen we een cohort van 100 experimentdieren volgen, waarin we transposons mobiliseren in aneuploid weefsel, en 50 controledieren, waarin we transposons mobiliseren in niet aneuploide weefsel. Deze cohortgrootte wordt bepaald door het aantal dieren noodzakelijk om genomewide de belangrijkste terugkomende integratie sites - common insertion sites of CIS - te identificeren. In elke tumor zullen op basis van sequencing de meest belangrijke integratiesites worden geïdentificeerd. Zo vinden we in elke tumor de zogenaamde 'driversmutaties' van de tumor. Omdat elke tumor 'uniek' is, zullen we daarna de integratiesites vergelijken binnen alle tumoren in het totale cohort. Op deze wijze kunnen we uitvinden welke drivermutaties vaker voorkomen binnen het cohort. Deze steeds terugkomende integratiesites (de CIS) zijn mogelijke specifieke drivers voor aneuploide tumoren en dus de kandidaatgenen die van aneuploide cellen aneuploide kankercellen maken. Onze ervaring en daarnaast de uitgebreide ervaring van onze collega's met dit type transposonscreen (zie ook (Rad et al, Nat. Gen. 2015 Jan;47(1):47-56) heeft uitgewezen dat met deze hoeveelheden dieren de meest belangrijke common insertion sites worden gevonden: de CIS worden dan voldoende vaak gevonden in de cohorten om zeker te zijn dat de belangrijkste drivers in dit type studie dan gevonden zijn.

Belangrijk om nogmaals te benadrukken is dat we deze screens sequentieel zullen uitvoeren te beginnen met het hematopoïetisch systeem. Alleen als blijkt dat een groot aantal hits in de eerste screen weefsel specifiek is, zullen we een screen in een volgend weefsel uitvoeren (zoals beschreven onder B). Na een tweede screen zullen we de overlap tussen de eerste twee screens bekijken en op basis daarvan beslissen of we in een derde en/ of vierde weefsel gaan screenen. We zullen daarnaast ook altijd beginnen met een pilotscreen om te kijken of er daadwerkelijk transposons-geïnduceerde tumoren ontstaan in het te onderzoeken weefsel.

Belangrijk: ook beschouwd vanuit een power-analyse is 40-50 dieren per cohort een reële schatting: in ons geval is de variatiecoëfficiënt sigma vooraf niet bekend; de proefgrootte wordt daarom afgelezen van een uit Owen afgeleide grafiek (Proefdieren en Dierproeven, L.F.M van Zutphen, vijfde druk, 2009, blz 211). Op basis van een onbetrouwbaarheidsdrempel (alfa) van 0.05 of een power ( $\pi$ ) van  $> 0.8$  en een verhouding tussen het te meten verschil ( $\mu_1 - \mu_2$ ) en variatiecoëfficiënt van ongeveer 0.7 (dit betekent dat er bij een spreiding van bijvoorbeeld 2 maanden in de overleving binnen 1 groep een significant verschil gemeten wordt als de gemiddelde overleving tussen experiment en controlegroep 1.5 maanden uit elkaar ligt; dit zijn reële waarden die we in de praktijk vaak waarnemen) valt er uit de grafiek af te lezen dat de proefgrootte ongeveer 40-50 dieren dient te zijn.

---

## **B. De dieren**

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

---

Alle experimenten zullen worden uitgevoerd op volwassen muizen. We maken gebruik van zowel mannen als vrouwen, tenzij we in de mamma kijken, dan gebruiken we alleen vrouwen. We verwachten namelijk geen sexe specifieke effecten. Voor dit type dierproef zullen alleen volwassen muizen uit eigen fok (heel soms bestellen we dieren vanuit extern, ██████████ gebruikt worden, in sommige gevallen zullen dieren als jong volwassene al behandeld worden op Cre te activeren.

2a)

Voor de transposonscreens (bloed, huid, cerebellum en darm):

We zullen MAXIMAAL in 4 weefsels transposonscreens uitvoeren (te beginnen in bloed), zie hierboven voor fasering en Go/No-Go keuzes. Hiervoor hebben we per weefsel maximaal 100 experiment dieren en 50 controledieren per weefsel nodig.

Subtotaal transposonscreens: 600 dieren

Voor de CRISPR screen zullen we 2 pilot cohorten (in hersenen en mamma) uitvoeren van 15 dieren elk. Voor een van deze weefsels (afhankelijk van de uitkomst van de pilot) zullen we een volledige screen doen (ook 100 dieren + 50 controledieren). Bij de volledige screen zullen we de 15 dieren van de pilot voor het uiteindelijk gekozen weefsel meenemen in het totaal aantal experiment dieren (100).

Subtotaal CRISPR screen: 165 (150 voor volledige screen inclusief de dieren in een van de pilots + 15 dieren in andere pilot die niet in volledige screen uitmond).

2b)

Aneuploide lymfocyt cohorten; T-cell specifiek en geheel bloed:

Experiment aneuploid T-cel lymfocyt cohort: 50 dieren, niet aneuploid controle T-cel lymfocyt cohort: 50 dieren

Experiment aneuploid bloedkanker cohort: 50 dieren, niet aneuploid controle bloedkanker cohort: 50 dieren

Subtotaal bloed: 200 dieren

Aneuploide medulloblastoma cohorten: In deze cohorten combineren we aneuploidie met een aantal bekende medulloblastoma predisposities in 4 verschillende combinaties van aneuploidie met of zonder ██████ verlies en met of zonder Myc overexpressie.

Per cohort (4 in totaal, inclusief controles) testen we maximaal 50 dieren.

Subtotaal brein 200 dieren

Aneuploide squamous cell carcinoma en basal cell carcinoma cohorten: Voor basal cell carcinoma testen we een genetisch model (aneuploide gecombineerd met Ptch1 verlies) en chemische carcinogenese. Voor squamous cell carcinoma testen we alleen een genetisch model (aneuploide gecombineerd met ██████ verlies).

Voor basal cell carcinoma testen we 3 cohorten (2 experimenteel, 1 controle) van maximaal 50 dieren en voor squamous cell carcinoma 2 cohorten van maximaal 50 dieren (1 experimenteel, 1 controle), dus in totaal 5 cohorten.

Subtotaal huid: 250 dieren

Aneuploide hepatocellulair adenoom/carcinoma:

Experiment aneuploide lever tumoren: 50 dieren, controle niet aneuploide lever tumoren: 50 dieren

Subtotaal lever: 100 dieren

Mammatumoren (WAP-Cre):

Aneuploide mammatumoren: 50 dieren, niet aneuploide controle mammatumoren: 50 dieren

Subtotaal mamma: 100 dieren

Darmkanker: Voor het modelleren van darmkanker zullen we twee verschillende combinaties van aneuploidie met verschillende predisposities (RasV12, ■■■, APC) en twee controle cohorten testen met maximaal 50 dieren per cohort.

Subtotaal darm: 200 dieren

Daarnaast genereren we ook enkele nieuwe conditionele modellen voor chromosomale instabiliteit (zoals beschreven in dierproeftype 1). Naast dat we onder dierproeftype 1 in deze modellen zullen kijken wat de effecten van de genmutaties zijn op aneuploidie in de muis, zullen we ook kijken of deze mutaties inderdaad leiden tot aneuploide kanker. Hiertoe zullen we in eerste instantie de mutaties activeren in het bloed (waar de tumorigenese in de muis in het algemeen het snelst verloopt) en misschien in huid. Omdat we deze kandidaatgenen nog in celkweek aan het testen zijn, weten we de gennamen hiervan nog niet. We verwachten de komende 5 jaar ongeveer 4 van deze modellen te genereren (zie ook onder dierproeftype 1). Per gen zullen we 1 tumorpredispositie (■■■ testen) in T-cellen. Het T-cel controle cohort (zie ook dierproeftype 1) dubbelt hier als controle. Per gen vragen we dan ook 50 dieren aan in dit type dierproef dus 200 in totaal.

Subtotaal nieuw te testen genen: 200 dieren

2c)

Metten groeisnelheid aneuploide tumoren: (■■■■■■■■■■); in T-cellen)

Om te meten of aneuploide tumoren sneller of langzamer groeien dan niet aneuploide tumoren, zullen we aneuploide tumoren isoleren uit onze twee modellen (■■■■■■■■■■) voor aneuploide T-ALL. Deze tumoren zullen we transplanteren in recipient muizen en meten hoe lang het duurt voordat deze tumorcellen een nieuwe tumor vormen in vergelijking met een transplantatie van een niet aneuploide tumor. Per genotype (3 in totaal) hebben we 50 donor dieren en 50 recipient dieren nodig, 300 in totaal. Voor 2 genotypes (100 dieren) kunnen we de donor tumorcellen isoleren uit dieren die we ook onder 2a (aneuploide T-cel tumoren) nodig hebben (vermindering).

Subtotaal: 200 dieren

Valideren rol kandidaatgenen (uit 2a) in maligne transformatie van aneuploide cellen naar aneuploide kankercellen

We verwachten ongeveer 10 genen per weefsel (voor maximaal 4 weefsels in totaal: huid, cerebellum, darm, bloed) in vivo te moeten valideren (het merendeel van de kandidaatgenen valt af op basis van eerste in celkweek validatie). Hiervoor moeten we 5 experiment en 5 controledieren per gen testen.

Subtotaal: 4 weefsels, 10 genen per weefsel, 10 dieren per gen = 400 dieren

Metten chromosomale instabiliteit en aneuploidie in tumoren:

We willen maximaal een totaal van 20 tumoren (10 aneuploide (experiment transplantaties) en 10 niet aneuploide (controle transplantaties)) onderzoeken.

Per tumor zullen we maximaal 5 muizen injecteren. We hebben hiervoor maximaal 100 dieren nodig.

Subtotaal aneuploidie metingen: 100 dieren.

Voor deze experimenten zullen we een aantal nieuwe muizenstammen genereren. We verwachten geen ongerief in de fok van deze dieren, maar omdat we

dit van te voren niet kunnen uitsluiten gelden de eerste twee generaties als fok met ongerief. Per genotype zetten we over het algemeen twee fokparen in, die we elk twee nestjes laten krijgen. Hiermee is een voldoende aantal dieren te krijgen om de juiste genotypes af te leiden en krijgen we voldoende dieren om met grote zekerheid vast te stellen dat de nakomelingen geen ongerief ondervinden. Per nieuw te genereren stam vragen we daarom 4 nesten (2 nesten per genotype, 2 generaties) nakomelingen met gemiddeld 12 pups, dus 48 dieren aan. Voor de hierboven beschreven cohorten zullen we in totaal 30 nieuwe genotypes genereren.

Subtotaal fok met ongerief:  $30 \times 48 = 1440$  dieren.

Totaal: 4155 dieren

---

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

Controlegroep al aanwezig in dierproeftype 1

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.

Waar mogelijk doen we onze experimenten met celkweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celkweek vaak anders op aneuploidie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploidie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploidie in diermodellen te onderzoeken.

De nieuw te testen kandidaatgenen voor chromosomale instabiliteit zullen we eerst in weefselkweek testen, zodat alleen relevante genen in de muis getest worden (vervanging en vermindering). Verder gebruiken we controlecohorten en het materiaal daaruit voor verschillende type dierproeven (hier dierproeftypes 1 en 2) (vermindering). In de keuze van onze weefsels die we onderzoeken, hebben we met name gekozen voor weefsels waarin tumoren snel opgemerkt worden en daarnaast en daarom tot relatief weinig ongerief leiden (verfijning). Door waar mogelijk pilotexperimenten te doen alvorens gehele cohorten te volgen kunnen experimenten waarbij geen significant verschil meetbaar is, worden voorkomen (vermindering). Daarnaast zullen we de transposonexperimenten gefaseerd uitvoeren en na elk experiment bekijken of we in meer weefsels willen kijken wat mogelijk leidt tot vermindering.

Verder maken we gebruik van het genetisch fluorescente labelen van tumoren waar mogelijk, zodat we tumoren kunnen opsporen voor ze tot ernstig ongerief



leiden (verfijning) en verschillende tumorstadia in kaart kunnen brengen door dezelfde muizen vaker te meten (vermindering).

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

Dieren in tumorcohorten worden minimaal 2 maal per week nauwkeurig geïnspecteerd op tekenen van ongerief. Gaande onze voortgang zullen we beter weten wanneer dieren ziek worden en rond die periode zullen we de waarnemingen intensiveren. Dieren zullen worden opgeofferd zodra ze de eerste tekenen van tumoren of ander ongerief vertonen zodat ongerief tot een minimum beperkt wordt. Hiertoe worden dieren dagelijks geïnspecteerd door medewerkers van de diervoorzorg en minimaal 2 maal per week door de verantwoordelijke onderzoeker.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

Deze proeven zijn nog niet eerder uitgevoerd. Hiervoor hebben we een uitgebreide zoekopdracht op PubMed uitgevoerd en daarnaast gesproken met onze diverse collega's die dit soort modellen ontwikkelen ( [REDACTED] )

## 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.

Dieren zullen bij eerste tekenen van ongerief/pljn worden opgeofferd.

Ja

## I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Motorische problemen in de cohorten met hersentumoren, jeuk bij dieren met (beginnende) huidtumoren, anemie bij dieren met lymphoma/leukemie, gewichtsverlies (bij alle dieren met tumoren), tumoren in de aangedane weefsels

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Aantasting van het functioneren van de aneuploide weefsels en uiteindelijk tumorvorming in deze weefsels

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

Dieren zullen zeer regelmatig (minimaal 2 maal per week) uitgebreid geïnspecteerd worden door de verantwoordelijke onderzoeker en worden dagelijks door de diervoorzorg gecontroleerd. De onderzoekers zullen de inspecties intensiveren als dieren in de periode komen dat de tumoren zich gaan ontwikkelen. Dieren zullen worden opgeofferd zodra ze ongerief ondervinden (motorische problemen, kortademigheid, zichtbare of palpeerbare tumoren, kromme rug, etc). Verder worden dieren opgeofferd als ze lethargisch zijn, meer dan 20% gewicht verloren zijn, of ernstige verwondingen (vechten, krabben) hebben.

## 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.

Doordat we de dieren regelmatig controleren en dit intensiveren in de periode dat de dieren ziek worden, zal alleen n de minderheid van de gevallen dieren dusdanig ernstig ziek worden dat de op basis van humane eindpunten opgeofferd dienen te worden, in onze ervaring is dit in minder dan 5% van de gevallen. Dit zal zijn als de dieren moribund zijn, ernstige motorische afwijkingen hebben (omvallen, meerdere malen epileptische aanvallen krijgen) lethargisch zijn, >20% van hun gewicht verloren zijn of ernstige (vecht)wonden hebben.

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

We streven ernaar dat zo min mogelijk dieren dit criterium zal halen, we verwachten minder dan 5% 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.

Het cumulatief ongerief schatten we in als matig.

## 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.

Dieren zullen uitgebreid worden onderzocht op macroscopische pathologie en weefels zullen worden opgestuurd voor histologie, zie ook de hierboven beschreven te meten uitkomstparameters. Verder zullen aangedane organen worden opgeslagen voor verder onderzoek (eiwit, RNA, DNA, aneuploidiemetingen, en transposonintegratiebepaling)

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.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  |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="3"/> | <input type="text" value="Muismodellen voor het visualiseren van aneuploidie en chromosoomsegregatie"/> |

*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.

In dit type dierproef zullen we in levende muizen chromosoomsegregatie en aneuploïdie visualiseren. Dit is belangrijk, omdat ons voorgaand werk laat zien dat aneuploidie (zoals onderzocht in de eerste twee dierproeftypes) in vivo beter getolereerd wordt dan we eerder aannamen. In dit dierproeftype willen we chromosoomsegregatie visualiseren middels intravital imaging, gebruikende van de diermodellen uit dierproeftype 1 en 2. Hiertoe ontwikkelen we muismodellen waarin we diverse structuren van mitotische cellen genetisch fluorescent labelen. Onze te generereerde conditionele muismodellen voor mitotische structuren zullen in eerste instantie worden ingekruisd met ons model voor aneuploidie in de huid, maar mogelijk ook in andere orgaansystemen (bijv darm): deze modellen zijn beschreven in deelaanvraag 1 en 2. Indien nodig, zullen we celdeling (of zelfs tumoren) induceren (genetisch dan/wel

chemisch), zoals beschreven in dierproeftype 2. Dieren zullen dan een intravital imaging window geïmplanteerd krijgen in huid of buikwand en dan onder verdoving gefixeerd worden onder een multi-photon microscoop opstelling zodat we individuele cellen kunnen volgen.

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.

Aneuploïde en niet aneuploïde mitotische marker dieren zullen window chambers geïmplanteerd krijgen, al dan niet na inductie van celdeling met TPA (2 x per week, enkele weken voorafgaande aan het imaging experiment; of DMBA (1x) + TPA, 2 keer per week totdat er tumoren ontstaan). DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene) dient als mutagen om mutaties in de huid aan te brengen, TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) leidt tot een ontstekingsreactie en daarmee celdeling tot celdeling: deze tweestaps carcinogenese is een efficiënte manier om huidtumoren in de muis te provoceren (Filler et al, CSH Protoc. 2007 Sep 1;2007:pdb.prot4837). DMBA en TPA zullen topisch worden aangebracht volgens een standaard huidmutagenese protocol (Filler et al, CSH Protoc. 2007 Sep 1;2007:pdb.prot4837). Door dit protocol treedt er alleen mutagenese lokaal in de huid op.

Voor imaging zullen de dieren gesedeerd worden en onder sedatie voor enkele uren gefixeerd worden onder de microscoop om individuele celdelingen te visualiseren en aneuploidie te quantificeren in vivo. De exacte protocollen zullen worden overgenomen van en geleerd bij het lab van [REDACTED].

[REDACTED] heeft protocollen waarbij de window chambers meerdere weken goed blijven zitten zonder ongerief voor de muizen: deze protocollen zullen we leren van de biotechnici bij [REDACTED] en hier implementeren.

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

Per weefseltype en genotype (eventueel met/zonder behandeling, zie toelichting dieren) zullen we maximaal 10 dieren monitoren, met maximaal 4 metingen per dier met minimaal 1 week tussen de individuele metingen. In deze opzet krijgen we in totaal per genotype 40 metingen (4 per dier, 10 dieren totaal), wat voldoende is om biologische verschillen significant aan te tonen: zie ook statistische toelichting onder dierproeftypes 1 en 2). Per genotype zullen we tot 2 types mitosemarker-muizen testen (met verschillende kleurcombinaties, verschillende (mitose) markers), daarom vragen we 20 dieren per genotype aan. We zullen ons in eerste instantie richten op imaging in de huid en darm (2 goed toegankelijke weefsels) en indien succesvol (Go) in tweede instantie ook op imaging van de mamma, en daarna mogelijk ook de lever.

In de aanloop zullen we 20 dieren gebruiken om de intravital imaging methodieken te leren ([REDACTED]) en te optimaliseren. We zullen pas de 'echte metingen' starten als we de imaging methodiek geoptimaliseerd hebben (Go), maar zijn vrij zeker dat dit zal lukken, omdat dit type imaging al routinematig gedaan wordt in het [REDACTED].

## **B. De dieren**

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

Alle experimenten zullen worden uitgevoerd op volwassen transgene muizen. We maken gebruik van mannen en vrouwen, omdat we geen verschillen verwachten tussen de sexes. Voor dit type dierproef zullen alleen volwassen muizen uit eigen fok (heel soms bestellen we dieren vanuit extern, zoals van [REDACTED]) gebruikt worden, in sommige gevallen zullen dieren als jong volwassene al behandeld worden op Cre te activeren. Binnen dit type dierproef zullen we de volgende cohorten volgen:

Optimaliseren imaging (mitose-marker): 20 dieren

Subtotaal 20 dieren

Huid:

Controle muizen; 2 te testen mitose-markers: 20 dieren

Aneuploide muizen; 2 te testen mitose-markers: 20 dieren

Controle muizen; inductie celdeling met TPA; 2 te testen mitose markers: 20 dieren

Aneuploide muizen; celdeling inductie met TPA; 2 te testen mitose markers: 20 dieren

Controle muizen; huidtumor inductie met DMBA/TPA; 2 te testen mitose markers: 20 dieren

Aneuploide muizen; huidtumorinductie met DMBA/TPA, 2 te testen mitose markers: 20 dieren

Subtotaal 120 dieren

Darm:

Controle muizen, 2 te testen mitose markers: 20 dieren

Aneuploide muizen, 2 te testen mitose markers: 20 dieren

Subtotaal 40 dieren

Indien imaging in huid en darm succesvol is zullen we ook nog in mamma en/of lever kijken. We hebben dan de bestaande mitosemarkers goed geanalyseerd en gebruiken hier dan alleen de meest geschikte mitosemarkermuis. We hebben hier dan 20 dieren per weefsel, 10 experiment, 10 controle voor nodig. Deze experimenten vinden plaats in nauw overleg met en met advies van [REDACTED].

Subtotaal 40 dieren.

Om alternatieven voor intravital imaging dierproeven te exploreren zullen we vanuit een aantal dieren organoids afleiden uit de darm en cerebellum. Hiervoor zullen we maximaal 10 reporterdieren opofferen per genotype voor 4 genotypes in maximaal 2 weefsels: 2 mitosemarkers, 10 experiment (genotype 1) en 10 controle (genotype 2) dieren: 80 dieren totaal. Deze organoids zullen we dan imageren als alternatief voor het imageren in dieren. Dit experiment kan aanleiding vormen om in een vervolgaanvraag meer experimenten in organoids te doen en minder in dieren.

Subtotaal 80 dieren

Subtotaal imaging: 300 dieren.

Voor deze experimenten zullen we een aantal nieuwe muizenstammen genereren. We verwachten geen ongerief in de fok van deze dieren, maar omdat we dit van tevoren niet kunnen uitsluiten gelden de eerste twee generaties als fok met ongerief. Per genotype zetten we over het algemeen twee fokparen in, die we elk twee nestjes laten krijgen. Hiermee is een voldoende aantal dieren te krijgen om de juiste genotypes af te leiden en krijgen we voldoende dieren om met grote zekerheid vast te stellen dat de nakomelingen geen ongerief ondervinden. Per nieuw te genereren stam vragen we daarom 4 nesten (2 nesten per genotype, 2 generaties) nakomelingen met gemiddeld 12 pups, dus 48 dieren aan. Voor de hierboven beschreven cohorten zullen we 10 nieuwe genotypes genereren.

Subtotaal fok met ongerief:  $10 \times 48 = 480$  dieren.

Totaal aangevraagd voor dierproeftype 3: 780 dieren.

---

**C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

---

**D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

Waar mogelijk zullen we i.p.v. dieren organoids (dus in weefselkweek) imagen (vervanging, vermindering) en bekijken of we in de toekomst meer met organoids kunnen als vervanging van dierproeven. Dieren zullen passende pijnstilling krijgen waar noodzakelijk (verfijning). Verder zullen we dezelfde dieren meerdere malen bekijken, wat dus leidt tot vermindering van het aantal proefdieren. Tenslotte zullen we de minst invasieve window chambers gebruiken: verfijning.

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.

Gedurende het gehele experiment zullen de muizen gesedeerd zijn, zodat ze geen ongerief ondervinden van het imagen. Dieren zullen tijdens en na de operatie van passende pijnstilling voorzien worden. Tenslotte zullen de dieren met imaging chambers nauwgezet gevolgd worden op de eventuele ontwikkeling van complicaties van de window chamber (lokale ontsteking) en hiervoor behandeld worden en opgeofferd worden indien dit te ernstig is/ niet behandelbaar is. De ervaring van [REDACTED] leert dat de imaging chambers zonder ongerief meerdere weken blijven zitten.

---

**Herhaling en duplicering**

---

**E. Herhaling**

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

Deze proeven zijn nog niet eerder uitgevoerd. Hiervoor hebben we een uitgebreide zoekopdracht op PubMed uitgevoerd en daarnaast gesproken met onze diverse collega's die dit soort modellen ontwikkelen ([REDACTED]  
[REDACTED])

---

**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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

De dieren ondervinden ongerief van de ingreep om het imaging window te implanteren en een deel van de dieren zal huidtumoren ontwikkelen die jeuk kunnen geven.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Chirurgische ingreep en huidtumoren.

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



Dieren met imaging windows zullen om de dag geïnspecteerd worden door onderzoekers en dagelijks door dierverzorgers en gedurende het imaging experiment constant in de gaten gehouden worden om te waarborgen dat ze goed verdoofd zijn en geen ongerief ondervinden.

#### **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 de minderheid van de gevallen zullen dieren dusdanig ernstig ziek worden dat de op basis van humane eindpunten opgeofferd dienen te worden. Dit zal zijn als de dieren moribund zijn, lethargisch zijn, >20% van hun gewicht verloren zijn, ernstige ontstekingen rondom de window chamber ontwikkelen, of ernstige (vecht)wonden hebben.

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

We verwachten dat minder dan 2% van de dieren moet worden getermineerd vanwege dit criterium.

#### **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 cumulatief ongerief schatten we in als matig.

### **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.

Dieren zullen uitgebreid worden onderzocht op macroscopische pathologie en weefsels zullen worden opgestuurd voor histologie. Verder zullen aangedane organen worden opgeslagen voor verder onderzoek (eiwit, RNA, DNA, en single cell sequencing in enkele gevallen). De histologie van de weefsels zal worden vergeleken met de intravital imaging data.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

# Format DEC-advies

---

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: (Intern RUG code **8044**)

Titel van het project: **De rol van aneuploidie in kanker**


Titel van de NTS: **De rol van aneuploidie in kanker**

2. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning**

3. Contactgegevens DEC:

naam DEC : **DEC-RUG**

telefoonnummer contactpersoon: 

mailadres contactpersoon : 

4. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: **13-01-2016**
- aanvraag complete: **13-01-2016**
- in vergadering besproken: **22-01-2016**
- anderszins behandeld: **09-03-2016**
- termijnonderbreking(en) van / tot: **22-01-2016 tot 23-02-2016**
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen. **n.v.t.**
- aanpassing aanvraag: **23-02-2016**
- advies aan CCD: **15-03-2016**

5. 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 wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

6. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **22-01-2016**
- Strekking van de vraag / vragen:  
**Gevraagd is naar een betere onderbouwing van het aantal dieren, betere beschrijving van de uitleesparameters en betere beschrijving van de connecties tussen de bijlagen**
- Datum antwoord:  
Strekking van het (de) antwoord(en): **De gevraagde verduidelijkingen zijn verwerkt in het projectvoorstel en de bijlages. De antwoorden hebben geleid tot uitgebreide aanpassing van de aanvraag.**

7. 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 **Ja**.
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 **substantieel**.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie / aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. **Ja, de experimenten die zijn voorgesteld zijn prima en gangbaar van opzet. Op deze wijze zal kennis over basale eigenschappen van aneuploidie en de effecten daarvan op een organisme verkregen worden. Aanvrager heeft ruime ervaring in dit veld en werkt samen met andere vooraanstaande wetenschappers. Waar nodig wordt kennis en expertise via samenwerkingen verkregen.**
5. Er is sprake van de volgende bijzonderheden op het gebied van categorieën van dieren, omstandigheden of behandeling van de dieren. **De onderzoekers gebruiken de muis, de keuze hiervoor is wetenschappelijk ruim voldoende onderbouwd.**
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. **Ja, die is realistisch ingeschat**
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. **Nee, dit werk kan in essentie alleen in levende, intacte organismen worden uitgevoerd**
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren lijkt realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. **Ja, het aantal dieren is beperkt tot wat wetenschappelijk kan worden verantwoord. Beide geslachten worden gebruikt, experimenten worden via pilots gefaseerd uitgevoerd om het aantal te beperken en gedood in voorraad te minimaliseren.**
9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de behandeling van de dieren zo humaan mogelijk wordt uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. **Ja, experimenten worden zodanig gedaan dat ongerief tot een minimum wordt beperkt. Onderzoek naar de effecten van**

**aneuploidie worden met name gedaan in weefsels waarvan het aannemelijk is dat de dieren relatief weinig last van deze effecten hebben. Er zijn geen belangwekkende milieueffecten te verwachten.**

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

## **D. Ethische afweging**

**Twee van de drie tumoren zijn aneuploide, terwijl het omliggende normale weefsel dat niet is. Dit biedt een uitstekend aanknopingspunt om met behulp van de hier voorgestelde dierproeven therapieën of strategieën te ontwikkelen die specifiek op aneuploide cellen zijn gericht. Het mogelijke maatschappelijk belang is helder, kanker is een veel voorkomende ziekte met grote maatschappelijke, sociale en economische gevolgen. Beter, specifiekere behandelingsmethoden zijn van groot belang. Onderzoek naar de systemen die aneuploidie reguleren en wat de gevolgen daarvan zijn voor een weefsel/organisme is nodig om de basale biologie van aneuploidie in de context van weefsel homeostase, veroudering en tumorigenese beter te begrijpen. Dergelijk onderzoek is deels alleen uit te voeren in dieren, en met name in muizen waarin veel genetisch gemodificeerde stammen beschikbaar zijn. Het gebruik van de diersoort zoals hier benoemd is daarom te rechtvaardigen. Hoewel de dieren worden geschaad in hun belangen (ze ervaren eventueel ongerief door de experimentele handelingen) is dit door de onderzoekers zo veel mogelijk beperkt en weegt het wetenschappelijk en op termijn maatschappelijk belang van het onderzoek daar tegen op.**

## **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op **consensus**.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan  
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  
AVD105002016465

**Bijlagen**

2

Datum 16 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002016465. 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: 01179037  
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan [REDACTED]  
Postcode en plaats: 9713AV GRONINGEN

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: Universitair docent  
Afdeling: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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



Gegevens gemachtigde

Postcode en plaats:

GRONINGEN

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 april 2020

Geplande einddatum:

31 maart 2021

Titel project:

De rol van aneuploidie in kanker

Titel niet-technische samenvatting:

De rol van aneuploidie in kanker

Naam DEC:

DEC-RUG

Postadres DEC:

A. Deusinglaan 1, [REDACTED]

E-mailadres DEC:

secrdec.umcg@umcg.nl

#### **Betaalgegevens**

De leges bedragen:

€ 1.441,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

#### **Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- Melding Machtiging
- DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

GRONINGEN



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan  
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  
AVD105002016465

**Bijlagen**

2

Datum 16 maart 2016  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 16 maart 2016  
Vervaldatum: 15 april 2016  
Factuurnummer: 16700465

| Omschrijving   | Bedrag     |
|--|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD105002016465 | € 1.441,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

t.a.v. [REDACTED]

A. Deusinglaan [REDACTED]

9713 AV Groningen

**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  
AVD105002016465

**Uw referentie**

uw ref

**Bijlagen**

1

Datum 09 mei 2016

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 16 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De rol van aneuploidie in kanker" met aanvraagnummer AVD105002016465. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

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

**Onduidelijkheden**

- 1) In bijlage 1 beschrijft u onder A dat "In geval van HSC transplantaties zijn 25 dieren per groep in onze ervaring voldoende". In de proef onder B waarin u donor en ontvangerdieren beschrijft, spreekt u echter over 50 dieren per groep. Kunt u dit verhelderen?
- 2) In bijlage 2 beschrijft u dat u controlecohorten en het materiaal daaruit gebruikt voor verschillende dierproeftypes. In bijlage 2 beschrijft u echter voor elke proef alsnog een controlecohort. Dit lijkt dubbel. Kunt u dit verhelderen?
- 3) In de NTS heeft u de ongeriefsclassificatie uitgesplitst van licht tot ernstig. In de bijlagen dierproeven spreekt u over licht dan wel matig ongerief. Kunt u de ongeriefsclassificatie in de projectaanvraag beter uitsplitsen?
- 4) Hiermee samenhangend willen wij u vragen beter te onderbouwen waardoor het ongerief bij de verschillende muismodellen wordt veroorzaakt.
- 5) De humane eindpunten die u beschrijft zijn algemene humane eindpunten. Is het mogelijk deze voor de verschillende modellen specifieker te maken?

6) In bijlage 3 beschrijft u dat u gebruik maakt van diermodellen uit bijlage 1 en 2, maar u voert ook het genereren van nieuwe muizenstammen op. Kunt u dit verhelderen?

**Datum**

09 mei 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD105002016465

7) In bijlage 3, vraag D schrijft u: "Gedurende het gehele experiment zullen de muizen gesedeerd zijn,...". Wij nemen aan dat u bedoelt dat de dieren tijdens het imagen gesedeerd zijn. Kunt u dit bevestigen?

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

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

**Opsturen binnen veertien dagen**

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

**Wanneer een beslissing**

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

**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



## 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.

Elke celdeling wordt ons erfelijk materiaal gerepliceerd en verdeeld over de twee nieuwe ontstane dochtercellen. Soms maken cellen een fout bij het verdelen van de chromosomen en ontstaan er twee cellen met een afwijkende hoeveelheid DNA. Dit proces noemen we chromosomale instabiliteit; de cellen met afwijkende hoeveelheden chromosomen noemen we aneuploïde. Kankercellen maken dit soort van fouten frequent en **twee van de drie tumoren zijn dan ook aneuploïde**. Omdat de omliggende gezonde cellen zelden tot niet aneuploïde zijn, vormt aneuploïdie een veelbelovend aangrijppunt voor kankertherapie. Om tot zulke therapie te kunnen komen, moeten we eerst beter begrijpen waarom de meeste kankers aneuploïde zijn en dus wat de gevolgen zijn van aneuploïdie voor het ontstaan van kanker.

Hiertoe zijn in de afgelopen 15 jaar diverse muismodellen gemaakt waarin systemisch (dus in alle weefsels van de muis) aneuploïdie werd geprovoceerd. In deze modellen werden genen uitgeschakeld in het 'mitotic spindle checkpoint', een mechanisme dat in mitose bepaalt of alle chromosomen correct gebonden zijn aan de mitotische spoel. Het inactiveren van dit mechanisme leidt tot frequente fouten in de chromosoomverdeling en dus tot aneuploïdie. Het systemisch inactiveren van genen in het mitotic spindle checkpoint leidt in alle gevallen tot vroege embryonale letaliteit (~E6.5). Heterozygote dieren lieten milde aneuploïdie zien en in sommige gevallen een iets verhoogde frequentie van kankers (als de dieren een kankerpredispositie lieten zien, ontwikkelde ongeveer 1/3 van de dieren tumoren na 18-24 maanden) (zie voor review: ██████████). In veel gevallen waren deze dieren wel gevoeliger voor geïnduceerde kankers (bijvoorbeeld door het inactiveren van ██████ of het blootstellen aan carcinogene stoffen). Samengevat hebben deze modellen ons geleerd dat chromosomale instabiliteit kanker versnelt maar dat het (in de muis) geen primaire oorzaak is van kanker. Verder lieten enkele van de modellen versnelde veroudering zien, wat suggereert dat aneuploïdie ook gerelateerd is aan veroudering. Ondanks dat deze modellen wel de relatie tussen aneuploïdie, kanker en veroudering hebben geschetst, zijn deze modellen minder geschikt om de moleculaire gevolgen van aneuploïdie in kanker te onderzoeken, omdat de tumoren in deze modellen zeldzaam zijn, in diverse weefsels ontstaan en pas laat in het leven van de muis. Om in deze modellen de gevolgen van aneuploïdie in kaart te brengen zouden onnodig veel dieren nodig zijn.

Wij hebben daarom conditionele knockout (cKO) muizen gemaakt, waarin we in weefsels naar keuze het mitotic spindle checkpoint kunnen uitschakelen (██████ cKO) of verzwakken (██████ cKO). Middels deze modellen onderzoeken we wat te moleculaire gevolgen zijn van aneuploïdie voor weefselontwikkeling, en verder hoe aneuploïdie leidt tot kanker. In deze modellen kunnen we ernstige aneuploïdie veroorzaken op weefselniveau en op deze wijze hebben we een tumormodel (T-cell acute lymphoblastic lymphoma) kunnen ontwikkelen, waarin 100% van de muizen binnen 3 maanden (██████████) of 4 maanden (██████████) aneuploïde lymphomen ontwikkelen. Dankzij deze modellen hebben we een zeer reproduceerbaar en gedefinieerd tumorcohort kunnen genereren, en kunnen we beter de moleculaire gevolgen van aneuploïdie in kaart brengen.

Zoals de eerdere modellen al suggereerden, laten ook onze modellen zien dat chromosomale instabiliteit alleen niet voldoende is voor kanker. We hebben dit



laten zien in T-cellen ( ), de lever ( ) en de huid ( ), wat aangeeft dat aneuploïde cellen nog extra mutaties nodig hebben om te transformeren in aneuploïde kankercellen. Daarnaast hebben we gevonden dat verschillende celtypes op verschillende wijze omgaan met aneuploïdie. Zo blijken T-cellen ( ), levercellen ( ) en basal epidermal cells ( ) vrij goed tegen aneuploïdie te kunnen, in tegenstelling tot bijvoorbeeld de bulge stamcellen van de huid, die in de haarfollikel liggen ( ). Dit laatste type cellen gaat net als cellen in weefselweek relatief snel dood (Kops et al, PNAS, 2004 Jun 8;101(23):8699-704) t.g.v. aneuploïdie. Dit geeft aan dat de verschillende celtypen op verschillende wijze omgaan met aneuploïdie en benadrukt het belang van weefselspecifieke knockouts om the komen tot therapieën die selectief aneuploïde kankers aanpakken.

### 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?

Ondanks dat twee van de drie kankers aneuploïde zijn, leidt aneuploïdie in weefselweek tot een groeinadeel, niet een groeivoordeel (Kops GJPL et al, Proc Natl Acad Sci USA. 2014;101:8699–704); (Williams BR, et al Science; 2008; 322:703–709). Dit suggereert dat aneuploïde kankercellen zich aan hebben weten te passen aan de nadelen van aneuploïdie. Dit betekent ook, dat als we beter begrijpen hoe aneuploïde kankercellen omgaan met de (nadelige) gevolgen van aneuploïde, we mogelijk kunnen komen tot manieren om aneuploïde kankercellen selectief te doden, het lange-termijn doel in mijn lab. Daarvoor moeten we in eerste instantie beter begrijpen hoe kankercellen en niet-kwaadaardige cellen omgaan met aneuploïdie. Hiervoor hebben we conditionele knockout allelen gegenereerd (voor ( ) en ( )) waarmee we aneuploïdie kunnen provoceren op weefselspecifiek niveau. Deze modellen stellen ons, in tegenstelling tot de vroegere modellen, in staat om gestructureerd te onderzoeken hoe weefsels en tumoren omgaan met aneuploïdie en hoe dit leidt tot kanker ( ). We onderzoeken hoe cellen aneuploïde worden, hoe aneuploïdie cellen helpt om kwaadaardig te worden en wat de fysiologische gevolgen zijn van aneuploïdie. Hiertoe stellen we in eerste instantie **drie vragen**:

1. Wat zijn de gevolgen van aneuploïdie voor 'niet-kankercellen'? Om deze vraag te beantwoorden brengen we de gevolgen van aneuploïdie in kaart in diverse weefsels (bijv. huid, lever, bloed, hersenen, mamma, darm). Hiervoor maken we gebruik van onze bestaande conditionele knockout allelen ( ) en ( ), gecombineerd met weefselspecifieke Cre-drivers achtergronden en zullen we vergelijken hoe verschillende weefseltypen omgaan met de gevolgen van aneuploïdie. Hiertoe zullen we dieren volgen in de tijd en op verschillende tijdstippen (maximaal tot een leeftijd van 18 maanden) opofferen en de weefsels in detail analyseren (transcriptome, proteome, epigenome, etc.) Een van de mogelijke gevolgen van aneuploïdie is versnelde veroudering (zie ook het werk van collega ( ), BubR1 hypomorph, zie ook ( ), S ( ). We zullen de relatie tussen aneuploïdie, veroudering en kanker dan verder onderzoeken als onderdeel van deze vraag door te bepalen of het aneuploïde weefsel (en mogelijk omliggende weefsels) verouderings-pathologie laten zien (stamceldepletie, neurodegeneratie, lineage skewing, weefseldegeneratie, etc.). We zullen de aneuploïdie-geïnduceerde pathologie vergelijken met 'normaal' verouderde muisweefsels, te verkrijgen uit de *Mouse Clinic for Cancer and Ageing*.
2. Wat is de rol van aneuploïdie in het ontstaan en de voortgang van kanker? Om deze vraag te beantwoorden, stellen we een drietal deelvragen:



et al/ Nat Methods; 2012; 9:1107–1112). Daarnaast zullen we de groeisnelheid van aneuploïde tumoren en niet aneuploïde tumoren vergelijken om te testen of aneuploïde tumoren nog steeds een groeinadeel ondervinden van de aneuploïdie en bepalen welk type veranderingen dit eventuele groeinadeel omzet in een groeivoordeel.

3. Hoe gedragen aneuploïde cellen zich *in vivo* en *in vitro*? Onze drivers voor chromosomale instabiliteit (verlies, truncatie) leiden in weefselkweek binnen een aantal passages tot celdood. Ons voorgaand werk laat duidelijk zien dat verlies/ truncatie wel getolereerd worden in een *in vivo* setting (lever, huid, T-cellen). Dat betekent dat er grote verschillen zijn in hoe weefselkweekcellen en cellen *in vivo* reageren op aneuploïdie. Om dit beter te begrijpen, ontwikkelen wij muismodellen om chromosoomsegregatie en aneuploïdie *in vivo* te visualiseren middels intravital imaging. Deze transgene muismodellen zullen conditioneel diverse fluorescente reporters tot expressie brengen en daarnaast een 'chromosoom tracker' waarmee we een specifiek getagged chromosoom kunnen volgen *in vivo* als een marker voor aneuploïdie. Deze modellen zullen we kruisen met onze muismodellen voor aneuploïdie (zie vraagstellingen 1, 2) in enkele weefsels (bijv. huid, darm). De transgenen en conditionele knockout allelen zullen dan *in vivo* geactiveerd worden met tamoxifen gevolgd door intravital imaging. Daarnaast zullen we ook weefsels isoleren van deze muizen voor organoid kweek. Op deze wijze kunnen we *in vivo* en *in vitro* gedrag van aneuploïde cellen vergelijken en daarnaast onze tracker modellen.

**Haalbaarheid:** De hierboven benoemde vragen kunnen we beantwoorden met de dierexperimenten beschreven in dit voorstel. Voor alle benoemde technieken en benaderingen hebben we of de modellen al beschikbaar, of kunnen we de modellen genereren samen met In vraag 2 en 4 genereren we een aantal nieuwe muismodellen. Hiervoor zullen we voor het genereren van de muizen samenwerken met de die brede ervaring heeft hiermee. Voor vragen 1 en 3 maken we gebruik van bestaande modellen die we inkruisen in nieuwe weefsel-specifieke drivers (te verkrijgen via ) eventueel gecombineerd met chemische mutagenese. Hiervoor maken we gebruik van bestaande protocollen. Vraag 2a betreft het screenen voor en valideren van genen die samen met aneuploïdie tot kanker leiden. Onze eerdere pilot-screens hebben laten zien dat deze aanpak zeer efficiënt werkt in T-cellen. We hebben al ervaring met aneuploïdie in andere weefsels (lever, huid) en kunnen deze screen dus eenvoudig in andere weefsels herhalen. Voor vraag 3 zullen we chromosoomsegregatie en aneuploïdie middels intravital imaging volgen. We hebben hier al ervaring mee vanuit het verleden . Hiertoe zullen we delende cel populaties specifiek labelen met de probes om zo het zoeken naar delende cellen te vereenvoudigen. In het geval we geen delende cellen kunnen vinden binnen de periode van ~6 uur dat we per muis kunnen imageren, kunnen we in ieder geval wel betrouwbaar het aantal aneuploïde cellen meten via de chromosoomtracker die we zullen genereren. Daarnaast zullen we in parallel middels organoid kweek van weefsels uit deze tracker muizen ook kijken naar chromosoomsegregatie in weefselkweek (vervanging). Voor deze imaging zullen we samenwerken met het lab van . Uiteindelijk zullen we ook binnen onze eigen imaging faciliteit op gaan imageren, waar de faciliteiten ook al geschikt zijn voor intravital imaging van muizen.

### 3.3 Belang

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

Het primaire belang van dit onderzoek is wetenschappelijk. 2 van de 3 kankers zijn aneuploïde. Ondanks dit gegeven, zijn er nog geen therapieën beschikbaar die selectief aneuploïde cellen kunnen bestrijden, terwijl aneuploïdie zo'n belangrijk onderscheidende factor van 'gezonde' lichaamscellen is. Om tot dergelijke therapie te komen, moeten we eerst beter begrijpen hoe cellen en weefsels omgaan met aneuploïdie. Dit doen we waar mogelijk met celkweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celkweek vaak anders op aneuploïdie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploïdie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploïdie in diermodellen te onderzoeken. Onze modellen zijn wereldwijd uniek

en hebben al belangrijke resultaten opgeleverd over aneuploidie en de gevolgen daarvan. In deze experimenten werken we deze bevindingen verder uit en komen we stap voor stap steeds dichterbij mogelijke therapieën die selectief aneuploïde cellen kunnen doden, welke zeer belangrijk kunnen worden in de behandeling van 2 van de 3 kankers, maar mogelijk ook kunnen helpen veroudering beter te begrijpen om uiteindelijk de gevolgen van het ouder worden te kunnen vertragen (healthy ageing), twee zeer belangrijke maatschappelijke belangen. Dit doen we waar mogelijk met celweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celweek vaak anders op aneuploidie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploidie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploidie in diermodellen te onderzoeken.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het overkoepelend doel van deze aanvraag is komen tot manieren om aneuploïde (kanker)cellen selectief te doden. Daartoe moeten we eerst begrijpen wat de gevolgen zijn van aneuploidie in verschillende weefsels en hoe aneuploïde cellen transformeren in kankercellen.

Hiertoe nemen we in parallel een drietal benaderingen:

- 1) We brengen de gevolgen van aneuploidie in niet getransformeerde weefsels (bijv. lever, huid, hersenen, bloed) en tumoren in kaart middels onze bestaande muismodellen voor aneuploïde en nieuw te genereren muismodellen voor aneuploidie (vragen 1 en 2b).
- 2) We onderzoeken welke genen en daarmee samenhangende fysiologische processen van aneuploïde cellen kankercellen maken (middels *in vivo* genetische screens en follow up *in vivo* kandidaat gen validatie (vraag 2)).
- 3) We visualiseren chromosoom(mis)segregatie en aneuploidie door intravital imaging in onze muismodellen voor aneuploidie in vergelijking met imaging van organoid cultures (*in vitro*) om de *in vivo* en *in vitro* gevolgen van chromosomale instabiliteit te kunnen bepalen en vergelijken (vraag 3).

Samenvattend, vergelijken we in deze aanvraag hoe verschillende weefsels reageren op aneuploidie en welke veranderingen de verschillende celtypen moeten doorstaan om kankercellen te worden, omdat ons voorgaand onderzoek heeft aangetoond dat verschillende celtypen verschillend reageren op aneuploidie. Om te komen tot aneuploidie-specifieke therapie, zullen we dus ook moeten weten hoe verschillende weefsels omgaan met aneuploidie. Door in verschillende weefsels de vier beschreven vragen te beantwoorden zullen de komende vijf jaar stappen dichterbij het overkoepelend doel: therapie die selectief aneuploïde kankercellen doodmaakt, therapie die we conceptueel en praktisch zullen testen in een in parallel ingediend projectvoorstel.

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

Het hier beschreven project valt uiteen in de volgende drie hoofdvragen.

1. Wat zijn de gevolgen van aneuploidie voor niet-kankercellen?
2. Wat is de rol van aneuploidie in het ontstaan en de voortgang van kanker?
3. Hoe gedragen aneuploïde cellen zich *in vivo* en *in vitro*?

Deze vragen zullen we beantwoorden middels 3 dierproeftypes:

- Dierproeftype 1: Muismodellen voor aneuploidie in niet getransformeerde cellen.
- Dierproeftype 2: Muismodellen voor aneuploidie in getransformeerde cellen.
- Dierproeftype 3: Muismodellen voor het visualiseren van aneuploidie en chromosoomsegregatie.

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.

In vraag 1 zullen we de gevolgen van aneuploidie in niet getransformeerde cellen onderzoeken. Dit zullen we onder deze vraag doen in diverse weefsels met een focus op niet-kanker gerelateerde pathologie. Een mogelijk gevolg van aneuploidie is versnelde veroudering van weefsels, dit is bijvoorbeeld aan aangetoond in het werk van [REDACTED], waarin ze waarnamen dat muizen met systemische (dus in alle organen tegelijk) aneuploidie diverse verouderingsziektes lieten zien, zoals staarvorming, kyphosis, haarverlies, vetverlies. We zullen weefsel-specifiek onderzoeken wat de gevolgen zijn van aneuploidie op bijv. het hematopoietisch systeem, de lever, de mamma, de hersenen, de darmen en de huid. Indien er aanleiding toe is, breiden we dit met meerdere weefsels uit, in overleg met de IvD. In de meeste gevallen zullen we hiervoor dieren kunnen gebruiken uit onze bestaande foklijnen zonder ongerief. In enkele gevallen zullen lijnen ongerief ondervinden van de weefsel-specifieke aneuploidie. In geval we een tamoxifen-induceerbare Cre hebben, zullen we dieren met tamoxifen moeten behandelen. Deze experimenten zullen inzicht geven hoe niet-getransformeerde cellen (dus zonder kanker-predispositie) reageren op aneuploidie en dus wat de algemene en/of weefsel-specifieke responsen zijn op chromosomale instabiliteit zoals mogelijk versnelde veroudering. Naast dat deze dierproeven inzicht geven in hoe verschillende weefsels omgaan met aneuploidie, dienen de cohorten voor deze vraag ook als controledieren voor de cohorten onder vraag 2b.

Voor vraag 2a zullen we trachten te identificeren welke genen van een aneuploïde cel een kankercel maken. Hiertoe zullen we *in vivo* genetische screens uitvoeren, in eerste instantie met transposons (PiggyBac) en in het hematopoietisch systeem. In dit muismodel worden transposons conditioneel gemobiliseerd samen met het inactiveren van de genen die de aneuploidie veroorzaken in de gekozen weefsels. De transposons blijven rondspringen gedurende de tumorontwikkeling: deze benadering werkt zeer efficiënt om sterke drivers van tumorigenese bloot te leggen: op die loci blijven de transposons juist behouden (Rad et al, Nat Genet. 2015 Jan;47(1):47-56). [REDACTED]

[REDACTED] Voor deze setup loopt reeds een eerste experiment na een succesvolle pilot vorig jaar als onderdeel van onze huidige vergunning. Gedurende jaar 1-2 van dit voorstel zal deze specifieke screen nog lopen. Als deze screen tot gevalideerde hits leidt (*i.e.* genen die van aneuploïde hematopoietische stamcellen kankercellen maken) en als we een duidelijke weefsel-specifieke respons op aneuploidie zien onder vraag 1, dan zullen we ook *in vivo* genetische screens uitvoeren in de huid en in het cerebellum. Deze genetische screens zullen we uitvoeren met het [REDACTED] of met een weefsel-specifiek CRISPR/Cas9 systeem (Platt et al Cell. 2014;159(2):440-55). Met deze screens zullen we starten zodra daartoe aanleiding is (zie hierboven), waarschijnlijk in jaar 3-5 van dit plan.

Voor vraag 2b zullen we in verschillende weefsels en middels verschillende extra predisposities de rol van aneuploidie in het ontstaan en de voortgang van kanker onderzoeken. Zodoende hopen we inzicht te krijgen in algemene en weefsel-specifieke manieren waarop tumorcellen omgaan met aneuploidie. Onder onze huidige vergunning volgen we een tumormodel voor bloed, een tumormodel voor lever en mammatumormodel. Onder deze CCD aanvraag zullen we nog enkele dieren volgen van deze bestaande lijnen gedurende de eerste twee jaar, daarna zullen de vragen voor deze modellen beantwoord zijn en zullen we de lijnen stoppen.

Daarnaast willen we onder vraag 2b onderzoeken wat de rol van aneuploidie is in het ontstaan van borstkanker, medulloblastoma, darmkanker en huidkanker. Hiertoe zullen we onze bestaande conditionele allelen voor aneuploidie (■■■■■■■■■■) of nieuw te genereren aneuploidie-inducerende allelen combineren met een chemische of genetische tumorpre-dispositie. Voor medulloblastoma zullen we cerebellum specifieke ■■■■ cKO dieren inkruisen met ■■■■ cKO dieren en/of c-Myc overexpresserende dieren. We verwachten dat dit model de eerste 3 jaar van de aanvraag zal lopen. Voor het induceren van darmtumoren zullen we aneuploidie in de darm combineren met darm-specifieke K-Ras<sup>V12</sup> of ■■■■ mutatie. Voor huidtumoren zullen we huid specifieke aneuploïde dieren in een Ptch conditionele achtergrond (basal cell carcinoma) of ■■■■ conditionele achtergrond (squamous cell carcinoma) kruisen of topisch behandelen met TPA en/of DMBA om proliferatie en transformatie te induceren. De darm en huidmodellen zullen we gedurende de laatste 3 jaar van deze aanvraag onderzoeken, maar alleen als uit de voorgaande modellen een duidelijke weefsel-specificiteit blijkt van hoe cellen omgaan met aneuploidie. Voor zowel het medulloblastoma-model, het darmmodel en het huidkankermodel zal Cre-recombinase geactiveerd worden met tamoxifen; de foklijnen voor deze dieren bestaan reeds en hebben geen ongerief.

Voor vraag 2c zullen we aneuploïde of controle hematologische tumorcellen sequentieel transplanteren in ontvanger muizen, bepalen hoe snel de cellen opnieuw tumoren vormen en meten hoe de karyotypes van de individuele cellen veranderen. De te transplanteren cellen voor en na transplantatie gemeten worden met single cell sequencing om te karyotype heterogeniteit te meten. In eerste instantie zullen we ons richten op hematologische kankers (Jaar 1-3 van deze aanvraag). Mogelijk breiden we dit naar andere orgaansystemen uit, maar alleen in nauw overleg met de IvD. De experimenten om de groeisnelheid van aneuploïde en niet aneuploïde tumoren te vergelijken zullen gedurende de eerste drie jaar van dit voorstel lopen. In dit voorstel zullen we daarnaast de in onze lopende transposon screen geïdentificeerde genen valideren in follow-up transplantatie experimenten. Hiertoe zullen we (aneuploïde) hematopoïetische stamcellen isoleren en hierin de kandidaatgenen activeren/inactiveren (zoals in de transposonscreen optrad) middels (conditionele) overexpressie of shRNA knockdown/CRISPR/Cas9 om te kijken of dit ook leidt tot transformatie van de aneuploïde hematopoïetische stamcellen. Deze validaties zullen gedurende de gehele duur van dit voorstel lopen.

Voor vraag 3 zullen we nieuwe muismodellen ontwikkelen om mitose, chromosoommissegregatie en aneuploidie in levende dieren te visualiseren in weefsels/celtypes naar keuze. De diermodellen zullen worden gegenereerd op de DEC/CCD vergunning van ■■■■■■■■■■■■ en dan ingekruist met onze tumormodellen uit vraag 2 en ontwikkelingsmodellen uit vraag 5. In eerste instantie zullen we ons richten op celdeling en aneuploidie in de huid en tumoren genetisch (■■■■ of Ptch) of chemisch (DMBA/TPA) induceren dan wel in 'normale' aneuploïde huid naar aneuploidie en celdeling te kijken. Experiment dieren zullen dan geïmaged worden. Hiertoe zullen we gebruik maken van minimaal invasieve imaging windows ■■■■■■■■■■■■. Verder zullen we in samenwerking met ■■■■■■■■■■■■ ) organoid cultures generen die we ook zullen imageren. Als we weinig tot geen delende cellen vinden met onze huidige Cre-driver voor de huid, kruisen we onze modellen ook nog in een selectievere Cre-driver die beter delende cellen labelt. Deze experimenten zullen in de eerste 3 jaar van dit voorstel worden uitgevoerd. Als de modellen goed blijken te werken, zullen we ook andere weefsels onderzoeken (bijvoorbeeld mamma, darm, etc.) in samenwerking met labs ■■■■■■■■■■■■

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

| Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 1          | Muismodellen voor aneuploidie in niet getransformeerde cellen.             |
| 2          | Muismodellen voor aneuploidie in getransformeerde cellen                   |
| 3          | Muismodellen voor het visualiseren van aneuploidie en chromosoomsegregatie |
| 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.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          | Muismodellen voor aneuploidie in niet getransformeerde cellen |

*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.

In dit type dierproef zullen we in verschillende weefsels van de muis (bijv. huid, lever, brein, bloed, darm of mamma) aneuploidie veroorzaken en de gevolgen (zoals mogelijk versnelde veroudering) voor de weefsels onderzoeken. We zullen aneuploidie veroorzaken met behulp van onze eerder gepubliceerde conditionele allelen  of  of door nieuwe te genereren drivers van aneuploidie. Om de aneuploidie weefsel-specifiek te provoceren, zullen onze conditionele knockout allelen gecombineerd worden met weefsel-specifieke Cre-drivers voor bijvoorbeeld de huid, het cerebellum, het bloed, de darm en de mamma. Cohorten van dieren zullen dan gevolgd worden gedurende enkele weken tot maximaal 18 maanden met een focus op aneuploidie-geïnduceerde pathologieën (veroudering, neurodegeneratie, stamceldepletie). Tussentijds zullen op geplande momenten dieren opgeofferd worden voor



uitgebreide moleculaire analyse en pathologie. In een klein deel van de gevallen zullen ontvanger muizen aneuploïde cellen (bijv. hematopoïetische stamcellen, HSCs) getransplanteerd krijgen om hun regeneratieve capaciteit te meten middels lineage tracing. Daarnaast zal een deel van de dieren een fluorescent reporter gen tot expressie brengen wat ons helpt om aneuploïde cellen te isoleren of volgen. Tenslotte zullen we een klein aantal dieren opofferen voor primaire celkweek doeleinden (vermindering en vervanging), zodat we een deel van onze experimenten met weefselkweek kunnen uitvoeren.

In deze dieren zullen we verschillende uitkomst parameters meten/bepalen.

Om te valideren dat de dieren inderdaad aneuploidie accumuleren in de getargete weefsels zullen we deze weefsels onderwerpen aan karyotypering middels single cell sequencen, metaphase spreads en interphase FISH. Dit gebeurt op ingevroren of gefixeerde cellen. Daarnaast zullen we de weefsels onderwerpen aan een histologische analyse, waar noodzakelijk gecombineerd met immunohistochemie (ingevroren en gefixeerde weefsels). Verder zullen we de respons op aneuploidie meten middels transcriptome analyse (RNA sequencing, qPCR) en middels biochemische bepalingen (Western Blots, en mogelijk mass spectrometrie op een select aantal samples (ingevroren weefsels). Tenslotte zullen we cellijnen afleiden uit diverse weefsels om verder celbiologische metingen te kunnen doen aan de aneuploïde weefsels (time-lapse microscopie, mechanistische experimenten, etc) (vers ingevroren weefsels in kweekmedium en vers in kweek genomen weefsels).

---

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.

In eerste instantie zullen de Cre-positieve lijnen worden gegeneerd (fok). Omdat bij deze fok nieuwe allelen worden gecombineerd, kunnen we niet met 100% zekerheid voorspellen of de nieuwe lijnen ongerief hebben. De eerste twee generaties van deze nieuwe lijnen gelden dus als fok met ongerief (zie ook aantallen dieren). De meerderheid van de dieren zullen geen verdere behandelingen ondergaan, dieren zullen alleen nauwlettend gevolgd worden op het ontstaan van pathologie op worden opgeofferd op diverse leeftijden. In een deel van de cohorten (wanneer we gebruik maken van induceerbare Cre-drivers) zullen dieren tamoxifen of PolyI/PolyC toegediend krijgen om Cre te induceren. Tamoxifen toediening zal plaatsvinden via orale toediening, IP injecties of in geval van netgeboren pups via injectie direct door de maagwand. PolyI/PolyC wordt IP toegediend. Dieren worden 4-5 keer behandeld binnen een periode van 2 weken. Deze toedieningsmethodieken zijn gebaseerd op onze eigen bestaande protocollen en noodzakelijk om voldoende Cre-activiteit te waarborgen. In geval de dieren een fluorescent reporter gen tot expressie brengen, zullen we in enkele gevallen de dieren imageren met een IVIS imaging station. Hiervoor worden de dieren licht gesedeerd en gedurende enkele minuten in het imaging station gelegd. De dieren worden dan teruggelegd in hun kooi om ze te laten bijkomen. Uiteindelijk zullen de dieren op verschillende tijden worden opgeofferd (cervicale dislocatie na isofluraan sedatie) om de diverse relevante weefsels te isoleren voor pathologie en moleculaire analyses, of, in enkele gevallen, voor HSC transplantaties.

---

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

In de meeste gevallen kennen we de latentie van de fenotypes/pathologie van de voren niet. Onze uitgebreide ervaring heeft ons geleerd, dat cohorten van 40-50 dieren per genotype in totaal voldoende zijn om een statistisch significant verschil aan te tonen tussen controle-groepen en dieren met een genetische predispositie (aneuploidie). In het geval van dit type dierproef zullen we controle en experimentdieren op verschillende leeftijden opofferen: hiervoor kiezen we ongeveer 5 tijdspunten gelegen tussen kort na geboorte en 18 maanden.

Om tot het minimum aantal noodzakelijke dieren te kunnen komen, zullen we daarom altijd starten met een pilotcohort van dieren (ongeveer 15 per groep, 3 per tijdspunt): dit geldt dus voor alle hieronder 'B aangevraagde dieraantallen' beschreven groepen. Deze dieren zullen dan worden geanalyseerd middels de hierboven beschreven uitleesparameters en dan zal er gekeken worden of we op basis van dit aantal dieren (en geïsoleerde weefsels) voldoende verschillen hebben kunnen waarnemen. Dan vindt een go/no go assessment plaats (zijn er verschillen waarneembaar op basis van de beschreven uitleesparameters?) en zo ja, dan zullen we in overleg met de IvD de groepsgrootte uitbreiden tot MAXIMAAL 50 dieren (10 per tijdspunt), afhankelijk van hoe groot de verschillen

zijn tussen de experimentgroep en controlegroep en op welke tijdstippen de verschillen waarneembaar zijn. In de meeste gevallen verwachten we dat we per groep minder dieren zullen nodig hebben. Als er op een bepaald tijdstip geen verschillen waarneembaar zijn na de assessment van de eerste 15 dieren, dan zullen we dit tijdstip niet verder onderzoeken en als er helemaal geen verschillen meetbaar zijn, dan zullen we concluderen dat de aneuploidie in deze setting geen effect heeft en geen extra dieren gebruiken (het blijft dan bij de eerste 15 gebruikte dieren).

Bij doorgang zullen na afronding van de experimenten en followup analyses alle dieren (dus pilot van 15 en extra aangevraagde dieren tot een maximum van 50 in totaal) als 1 experimentgroep beschouwd worden. Correctie voor multiple testing is dan ook niet noodzakelijk. De eerste 15 dieren als pilot: we gaan ervan uit (op basis van voorgaande kennis) dat 15 dieren niet voldoende is om een significant verschil tussen dieren aan te tonen. Omdat de genotypes die we testen een onbekend fenotype hebben, kunnen we niet 100% voorspellen wat de verschillen in fenotype tussen de dieren zullen zijn. Mocht dit verschil groter zijn dan hier ingeschat, dan zullen we post-hoc een nieuwe power analyse uitvoeren met de dan nieuw bekende gegevens (i.e. het verschil in overleving tussen de groepen en de verdeling van experimentwaardes) om zo vast te stellen of de 15 dieren voldoende zijn voor een statistisch significant verschil of dat er nog meerdere dieren noodzakelijk zijn.

In geval van HSC transplantaties zijn 25 dieren per groep in onze ervaring voldoende.

Belangrijk: ook beschouwd vanuit een power-analyse is 40-50 dieren per cohort een reële schatting: in ons geval is de variatiecoëfficiënt sigma vooraf niet bekend; de proefgrootte wordt daarom afgelezen van een uit Owen afgeleide grafiek (Proefdieren en Dierproeven, L.F.M van Zutphen, vijfde druk, 2009, blz 211). Op basis van een onbetrouwbaarheidsdrempel (alpha) van 0.05 of een power (pi) van  $> 0.8$  en een verhouding tussen het te meten verschil ( $\mu_1 - \mu_2 / \sigma$ ) en variatiecoëfficiënt van ongeveer 0.7 (dit betekent dat er bij een spreiding sigma van bijvoorbeeld 2 maanden in de overleving binnen 1 groep een significant verschil gemeten wordt als de gemiddelde overleving tussen experiment en controlegroep 1.5 maanden uit elkaar ligt; dit zijn reële waarden die we in de praktijk vaak waarnemen) valt er uit de grafiek af te lezen dat de proefgrootte ongeveer 40-50 dieren dient te zijn.

---

## **B. De dieren**

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

Alle experimenten zullen worden uitgevoerd op transgene muizen. We maken gebruik van zowel mannen als vrouwen behalve in geval van de mamma-experimenten (daar gebruiken we alleen vrouwen), omdat er geen reden is om aan te nemen dat we verschillen zullen zien tussen de sexes. Voor dit type dierproef zullen alleen volwassen muizen uit eigen fok (heel soms bestellen we dieren vanuit extern, zoals van ██████████) gebruikt worden, in sommige gevallen zullen dieren als jong volwassene al behandeld worden op Cre te activeren. Binnen dit type dierproef zullen we de volgende experimentele en controle cohorten volgen:

Aneuploidie in bloed:

1 experimenteel en 1 controle cohort voor aneuploïdie in T-cellen:  $50+50 = 100$  dieren

1 experimenteel en 1 controle cohort voor aneuploïdie in het hematopoïetisch systeem:  $50+50 = 100$  dieren

1 experimenteel en 1 controle cohort voor transplantaties van aneuploïde cellen in het hematopoïetisch systeem:  $25+25$  donor dieren +  $50$  recipient dieren =  $100$  dieren

Subtotaal 300 dieren

Aneuploidie in de kleine hersenen:

1 experimenteel en 1 controle cohort voor induceerbare aneuploidie in de kleine hersenen:  $50+50 = 100$  dieren

Subtotaal 100 dieren

Aneuploidie in de huid en darm:

1 experimenteel en 1 controle cohort voor induceerbare aneuploidie in de epidermis:  $50+50 = 100$  dieren

1 experimenteel en 1 controle cohort voor induceerbare aneuploidie in de darm:  $50+50 = 100$  dieren

1 experimenteel en 1 controle cohort voor induceerbare aneuploidie in de stamcellen van de darm en huid:  $50+50 = 100$  dieren

Subtotaal 300 dieren

Aneuploidie in de lever:

1 experimenteel en 1 controle cohort voor aneuploidie in de lever:  $50+50 = 100$  dieren

Subtotaal 100 dieren

Aneuploidie in de mamma:

1 experimenteel en 1 controle cohort voor aneuploidie in mamma epitheel:  $50+50 = 100$  dieren

Daarnaast genereren we ook enkele nieuwe modellen voor chromosomale instabiliteit, die we in eerste instantie zullen testen in het bloed en de huid. Omdat we deze kandidaatgenen nog in celkweek aan het testen zijn, weten we de gennamen hiervan nog niet. We verwachten de komende 5 jaar ongeveer 4 van deze modellen te genereren waarvan we de gevolgen willen bekijken in 2 weefsels (dus 8 stammen), waarvoor we per cohort maximaal 50 dieren zullen volgen. Voor de controle cohorten voor bloed en huid zijn hierboven al dieren aangevraagd.

Subtotaal nieuw te testen genen: 400 dieren

Ook zullen we vanuit een deel van deze verschillende modellen primaire cellen isoleren (vervanging en vermindering van dierproeven)

Hiervoor vragen we de volgende hoeveelheid dieren aan:

Ten bate van primaire keratinocyten: 20 dieren

Ten bate van mouse embryonic stem cells: 20 dieren (moeders; embryo's zijn pas op E3.5 en tellen nog niet als proefdier)

Ten bate van mouse embryonic fibroblasts (40 dieren en 400 E13.5 embryo's)

Ten bate van darm organoids: 20 dieren

Ten bate van mamma organoids 20 dieren

Subtotaal primaire kweek: 120 dieren en 400 embryo's.

Voor deze experimenten zullen we een aantal nieuwe muizenstammen genereren. We verwachten geen ongerief in de fok van deze dieren, maar omdat we dit van te voren niet kunnen uitsluiten gelden de eerste twee generaties als fok met ongerief. Per genotype zetten we over het algemeen twee fokparen in, die we elk twee nestjes laten krijgen. Hiermee is een voldoende aantal dieren te krijgen om de juiste genotypes af te leiden en krijgen we voldoende dieren om met grote zekerheid vast te stellen dat de nakomelingen geen ongerief ondervinden. Per nieuw te genereren stam vragen we daarom 4 nesten (2 nesten per genotype, 2 generaties) nakomelingen met gemiddeld 12 pups, dus 48 dieren aan. Voor de hierboven beschreven cohorten zullen we 17 nieuwe genotypes genereren.

Subtotaal fok met ongerief:  $17 \times 48 = 816$  dieren.

Het totaal aantal dieren voor dit type dierproef komt daarmee op 2236 volwassen dieren en 400 embryo's

### 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.

Waar mogelijk doen we onze experimenten met celkweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celkweek vaak anders op aneuploidie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploidie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploidie in diermodellen te onderzoeken.

We hebben het minimum mogelijk aantal dieren per groep gekozen (vermindering) en starten in alle gevallen met een klein pilotcohort om te bepalen of er meetbare verschillen tussen experiment en controledieren zijn. Daarnaast dienen de experimentdieren in dit dierproeftype als controlecohorten voor de tumorproeven onder dierproeftype 2. Daarnaast gebruiken we de experimentdieren om te leren wat de gevolgen van aneuploidie zijn in een niet getransformeerde setting. Op deze wijze beantwoorden we twee vragen met deze cohorten en verminderen we het totaal aantal benodigde dieren.

We hebben zoveel mogelijk gekozen voor weefsels waar afwijkingen relatief weinig ongerief opleveren als verfijning. Bovendien kiezen we voor een deel van de experimenten voor een weefselkweek benadering (vermindering, vervanging) en proberen meerdere dingen van dezelfde dieren te leren (bijvoorbeeld fenotypes voor stamcellen in de darm en huid kunnen we in 1 experiment tegelijk onderzoeken). Tenslotte maken we waar mogelijk gebruik van tussentijdse non-invasieve metingen in de lineage tracing experimenten (vermindering, verfijning) zodat hetzelfde dier meerder malen gemeten kan worden wat leidt tot vermindering van het totaal aantal benodigde dieren.

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

Aangezien onze voorgaande kennis uitwijst dat aneuploïde verbazingwekkend goed getolereerd wordt in vivo, verwachten we weinig tot geen ongerief in dit type dierproef. Alle dieren in experiment zullen intensief gecontroleerd worden (dagelijkse controle door dierversorgung en minimaal 2 maal per week

intensievere controle door de onderzoekers) om uit te sluiten dat de dieren ongerief ondervinden.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

Deze proeven zijn nog niet eerder uitgevoerd. Hiervoor hebben we een uitgebreide zoekopdracht op PubMed uitgevoerd en daarnaast gesproken met onze diverse collega's die dit soort modellen ontwikkelen ( [REDACTED] )

## 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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er wordt weining ongerief verwacht. Bovendien zullen dieren nauwgezet gevolgd worden en worden opgeofferd bij de eerste tekenen van ongerief indien die zich toch voordoen. Meer specifiek:

- Voor de modellen van het hematopoietisch systeem kan stamceldepletie optreden, wat kan leiden tot beginnende anemie (bleke oren, kortademigheid) (licht ongerief).
- Voor de modellen van het cerebellum is het mogelijk dat aneuploidie tot milde motorische afwijkingen leidt ten gevolge van neurodegeneratie (licht ongerief).
- Voor de modellen van de huid zullen dieren mogelijk een deel van hun vacht verliezen (licht ongerief).
- Voor de modellen van de mamma zullen dieren mogelijk defecten ontwikkelen in de mammaontwikkeling, dit zal niet tot direct ongerief leiden, maar hiermee dient wel rekening gehouden te worden als de vrouwtjes pups krijgen, omdat mogelijk de melkproductie hieronder leidt (licht ongerief).
- Voor de modellen van de darm kan stamceldepletie leiden tot villidegeneratie. Dit zal leiden tot verminderde voedselopname en gewichtsverlies (licht ongerief).
- Voor de modellen van de lever kan een defect in lever-regeneratie optreden. Bij een normale levensloop zal dit niet leiden tot enig ongerief omdat de lever niet hoeft te regenereren (licht ongerief).
- Verder kunnen in alle onderzochte weefsels weefsel-specifieke verouderingspathologieën optreden, zoals stamceldepletie, en/of senescence, wat uiteindelijk (in de latere tijdspunten) tot verminderde weefselfunctionaliteit zal leiden. Ook hier offeren we dieren op voordat ze licht ongerief overschrijden.
- In de laatste tijdspunten (dieren ouder dan een jaar) zullen dieren ook 'natuurlijk' verouderen. Dit kan leiden tot de bij muis bekende verouderingsaandoeningen zoals tumoren, blindheid, prolapsen, huidaandoeningen. We zullen hier de dieren niet langer dan 18 maanden houden om extreme veroudering te voorkomen en dieren opofferen voordat het ongerief 'licht' overstijgt.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Op basis van onze voorgaande kennis voorzien we dat in sommige gevallen de aneuploidie kan leiden tot stemcel depletie (we hebben dit eerder in de huid waargenomen). Stamceldepletie kan leiden tot het minder functioneren van een weefsel. Dus voor alle te onderzoeken weefsels geldt dat stamceldepletie en/of slecht functioneren van de somatische cellen kan leiden tot een verminderde functionaliteit van het weefsel. Bij de dieren ouder dan een jaar kunnen aandoeningen ook ontstaan door natuurlijke veroudering. Zoals aangegeven zal dit alles nauwlettend in de gaten gehouden worden en zullen dieren worden opgeofferd voordat ze matig of zelfs ernstig ongerief ondervinden.

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

Dieren zullen zeer regelmatig (minimaal 2 maal per week) uitgebreid geïnspecteerd worden door de verantwoordelijk onderzoeker en dagelijks door de diervoorzorg om ongerief te voorkomen. Dieren worden opgeofferd als het ongerief 'gering' overstijgt. In geval van hoger ongerief dan voorzien (gering) door bijvoorbeeld neurodegeneratie of villi-degeneratie zal de dosis van tamoxifen verlaagd worden (noodzakelijk om de knockout genen te inactiveren) om zo mozaïsche aneuploidie te provoceren (en daarmee een milder fenotype). Doordat de aneuploïde cellen bij deze weefsels ook een fluorescente reporter tot expressie brengen, kunnen we de aneuploïde cellen dan alsnog isoleren uit de weefsels.

### **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 een heel enkel geval kan het voorkomen dat een dier dusdanig ernstig ziek wordt dat het op basis van humane eindpunten opgeofferd dient te worden. Dit geldt voor alle beschreven experimenten. Het ongerief van deze dieren wordt inschat als matiger. Onze ervaring met voorgaande modellen voor aneuploidie in een niet-kanker setting leert dat deze aantallen kleiner dan 2% van de dieren betreft. In dit dierproeftype zal dit naar verwachting alleen optreden als de dieren ernstig gevochten hebben, aangezien we geen ernstige pathologie verwachten met aneuploidie alleen en we eventuele pathologie nauwgezet volgen. De te verwachten specifieke fenotypes (neurodegeneratie, darmvillidegeneratie) zullen we nauwlettend van dag tot dag volgen, zodat dieren (vrijwel) nooit dusdanig ongerief hebben dat ze moeten worden opgeofferd op basis van humane eindpunten maar altijd ruim voor die tijd. Mocht er toch een ernstiger fenotype optreden dan voorzien (dus met matig ongerief), dan zullen we de fractie aneuploide cellen in de volgende muizen verlagen door minder tamoxifen toe te dienen waardoor minder cellen aneuploide worden en het fenotype terug zal afzwakken maar licht ongerief.

De criteria die wij hanteren voor dit dierproeftype om dieren op basis van humane eindpunten op te offeren zijn als de dieren ernstige vechtwonden hebben (meest waarschijnlijk optredende reden voor terminatie op basis van humane eindpunten), moribund zijn, lethargisch zijn, >20% van hun gewicht verloren zijn (bijvoorbeeld door darmvillidegeneratie), significante neurologische afwijkingen laten zien (balansproblemen), of verouderingsafwijkingen laten zien (spontane tumoren, prolapsen, huidaandoeningen).

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

We verwachten voor deze proef dat minder dan 2% van de dieren op basis van humane eindpunten opgeofferd dienen te worden.

### **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 cumulatief ongerief schatten we in als licht: geen van deze dieren zullen ernstige afwijkingen ontwikkelen. We verwachten dat <2% van de dieren op basis van humane eindpunten moet worden opgeofferd (zie hierboven; matig ongerief). 98% van de dieren ondervindt dus licht en 2% van de dieren ondervindt matig ongerief.

## **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.

Dieren zullen uitgebreid worden onderzocht op macroscopische pathologie en weefsels zullen worden opgestuurd voor histologie. Verder zullen aangedane organen worden opgeslagen voor verder onderzoek (eiwit, RNA, DNA, aneuploidie metingen) zoals beschreven onder uitleesparameters.

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.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  |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="2"/> | <input type="text" value="Muismodellen voor aneuploidie in getransformeerde cellen"/> |

*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.

In dit type dierproef onderzoeken we de relatie tussen chromosomale instabiliteit en kanker. Ons voorgaand onderzoek heeft uitgewezen dat chromosomale instabiliteit in de levensduur van een muis niet voldoende is om reproduceerbaar tot kanker te leiden (zie ook dierproeftype 1). Om beter te begrijpen hoe aneuploidie tot kanker leidt en hoe deze aneuploide kankers zich gedragen zullen we a) zoeken naar genen die samen met aneuploidie leiden tot kanker (middels genetische mutagenese (transposons, CRISPR)); zullen we b) onze bekende of nieuwe drivers voor chromosomale instabiliteit combineren met bekende tumorpre-disposities (bijv. ■■■■, Ptch, Myc, Ras) of chemische mutagenese om aneuploide tumoren in diverse weefsels te veroorzaken; en c) humane en muizekankers transplanteren in de muis om te vergelijken hoe snel aneuploide en nieuw-aneuploide tumoren groeien en hoe frequent deze tumoren

chromosomen missgegregeren.

Voor deelvraag a) zullen we een genetische in vivo screens uitvoeren (transposon of CRISPR) in enkele weefsels (bloed; kleine hersenen, darm en huid). Hiertoe zullen we onze conditionele knockout muizen inkruisen in een conditionele transposon of conditionele CRISPR achtergrond. Het genoom van het te targetten aneuploide weefsel zal dan worden gemutageniseerd (door transposons of CRISPR-libraries) en dieren zullen dan worden gevolgd op het ontstaan van tumoren. Zodra dieren ziek worden, zullen ze worden opgeofferd en de ontstane tumoren zullen worden geanalyseerd op driver-mutaties in de tumoren. We zullen beginnen met een eerste screen in bloed (pilot screen hiervan is al uitgevoerd onder oude vergunning) en daarin bepalen welk deel van de hits (genen die aneuploide bloedcellen veranderen in leukemiecellen) specifiek zijn voor bloedcellen en welke meer een algemene rol hebben in de celbiologie. Als er een groot deel van de significante hits weefselspecifiek zijn (dat is de verwachting), dan zullen we de transposonscreen uitbreiden naar andere weefsels (Go). We zullen die uitbreiding weefsel voor weefsel doen, waarbij we altijd eerst een pilotscreen zullen uitvoeren zoals hieronder beschreven. Mocht onze eerste transposonscreen met name 'algemene hits' opleveren, en het daarom aannemelijk is dat we geen extra hits zouden vinden in andere weefsels, dan beperken we ons tot 1 transposonscreen (No-Go).

Voor deelvraag b) zullen we ontstane tumoren in de verschillende modellen onderling vergelijken om de weefselspecifieke en algemene respons tegen aneuploidie in kaart te brengen. Onze eerste aanwijzingen uit voorgaand onderzoek laten zien dat er grote verschillen zijn tussen hoe verschillende weefsels/tumortypes regareren op aneuploidie. Daarom willen we dit nu voor meerder weefsels goed in kaart brengen. In eerste instantie zullen we ons richten op bloed, lever, huid, (kleine) hersenen, darm en borst. ■■■■ (en in sommige gevallen ook ■■■■) of nieuw te genereren conditionele allelen voor chromosomale instabiliteit zullen in een tumorpredispositieachtergrond gekruisd worden (bijv. ■■■■ (huid, bloed, lever), Ptch1 (huid, cerebellum), Myc (cerebellum), mutant Ras (huid, darm), APC (darm), Her2 (mamma). Per weefsel zullen we 1 of enkele cohorten van dieren opzetten en volgen op het ontstaan van tumoren. Dieren zullen nauwlettend worden gevolgd (minimaal 2 maal per week) op het ontstaan van tumoren door veranderingen in gedrag en gewicht te monitoren, en/of uiterlijke veranderingen zoals zichtbare (huid) of palpeerbare (mamma) tumoren. In geval van de huid zullen we ook in een cohort dieren tumoren chemisch induceren (DMBA, TPA). Dieren zullen worden opgeofferd bij de eerste tekenen van tumoren om ongerief tot een minimum te beperken. Voor deze experimenten zullen eerst 15 dieren worden ingezet als pilot en als er meetbare verschillen zijn (Go), zal dit worden uitgebreid tot maximaal 50 dieren per cohort, zo niet, dan zal dit cohort niet verder opgevolgd worden (No-Go)

Voor deelvraag c) zullen dieren (tumor)cellen ingespoten krijgen om de groeisnelheid van de cellen in vivo te bepalen, om te kijken of de cellen zich gedragen als 'echte kankercellen' en om te bepalen hoe vaak de cellen chromosomen missegregeren. In de meerderheid van de experimenten zullen dieren hematologische (tumor)cellen ingespoten krijgen in het bloed en zal gevolgd worden of deze tumoren gaan groeien in de muis. In enkele gevallen zullen muizen subcutaan tumorcellen ingespoten krijgen om te kijken of cellen maligne zijn. In dit geval zullen de muizen onderhuidse tumoren ontwikkelen.

In de dieren zullen we verschillende uitkomst parameters meten/bepalen.

De allereerste belangrijke uitkomstparameter voor dit dierproeftype is tumorlatentie en/of tumorgrootte. Waar mogelijk meten we dit met non-invasieve imaging (fluorescent gelabelde tumoren te meten middels IVIS imager)

Daarnaast zullen we in de transposon-geïnduceerde tumoren meten waar de transposons geïntegreerd zijn (middels sequencing) om te kijken hoe de aneuploide cellen veranderd zijn in kankercellen.

Om te valideren dat de dieren inderdaad aneuploidie accumuleren in de getargete weefsels zullen we deze ontstane tumoren onderwerpen aan karyotypering middels single cell sequencing, metaphase spreads en interphase FISH. Dit gebeurt op ingevroren of gefixeerde tumorcellen.

Daarnaast zullen we de tumoren onderwerpen aan een uitgebreide histologische analyse, waar noodzakelijk gecombineerd met immunohistochemie

(ingevroren en gefixeerde weefsels). Verder zullen we de respons op aneuploidie meten middels transcriptome analyse (RNA sequencing, qPCR) en middels biochemische bepalingen (Western Blots, en mogelijk mass spectrometrie op een select aantal samples (ingevroren weefsels). Tenslotte zullen we cellijnen afleiden uit diverse tumoren om verder celbiologische metingen te kunnen doen aan de tumorcellen (time-lapse microscopie, mechanistische experimenten, etc) (vers ingevroren tumoren in kweekmedium en vers in kweek genomen tumoren).

---

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.

Voor deelvraag a) zullen we conditioneel aneuploide muizen kruisen met stammen waarin induceerbaar transposons gemobiliseerd kunnen worden. Cre zal dan met tamoxifen geïnduceerd worden (oraal of IP, 4-5 behandelingen binnen 2 weken, of IP PolyI/PolyC, 4-5 behandelingen om de dag) waarbij het te targetten weefsel aneuploide wordt en tegelijkertijd de transposons zullen mobiliseren. Dieren zullen dan gevolgd worden op het ontstaan van tumoren. We hebben al een succesvolle pilotscreen lopen voor bloed en willen nu ook screenen in de huid en het cerebellum om weefselspecifieke drivers van aneuploide kankers in deze weefsels bloot te leggen.

Omdat we de tumorlatentie niet kennen, zullen we eerst pilotcohorts van ongeveer 15 dieren volgen, om te bepalen of de transposons in het te bestuderen weefsel in combinatie met aneuploidie leidt tot tumoren. Als dit het geval is (validatie pilot, Go), dan zullen we in overleg met de IvD een compleet cohort inzetten van 100 dieren totaal (85 extra dieren, waarbij de 15 pilot dieren het cohort compleet maken). Mocht de pilot uitwijzen dat de dieren geen of te weinig tumoren krijgen om genetische drivers van aneuploide kanker te vinden, dan zullen we de proef voor het betreffende weefsel niet uitbreiden naar een compleet cohort (No-Go).

Als een pilot voor een ander type genetische screen zullen we onze conditionele aneuploide muizen inkruisen met de conditionele CRISPR muis (Platt et al Cell. 2014;159(2):440-55). Dieren zullen dan viraal CRISPR-guideRNA libraries toegediend krijgen en gevolgd op het ontstaan van tumoren. Omdat deze technologie nog zeer jong is, zullen we hiervoor eerst 2 kleine pilots uitvoeren, 1 in hersenen en 1 in de mamma. Als dit type screen in de pilots succesvol is (de dieren ontwikkelen reproduceerbare tumoren), dan zullen we een van deze twee weefsels kiezen (met de kortste tumor latentie of minste ongerief) voor een complete screen (Go). In de pilots zullen dieren intraveneus lentiviraal virus toegediend krijgen coderend voor de guideRNAs volgens de geldende protocollen in de literatuur.

Voor deelvraag b) zullen dieren in een deel van de cohorten geen behandelingen ondergaan, dieren zullen alleen nauwlettend gevolgd worden op het ontstaan van de genetisch geïnduceerde tumoren. In een ander deel (wanneer we gebruik maken van induceerbare Cre-drivers) zullen dieren tamoxifen of PolyI/PolyC toegediend krijgen om Cre te induceren. Dieren zullen dan nauwlettend gevolgd worden op het ontstaan van tumoren. Een deel van de tamoxifen behandelde dieren (het cohort waarin we kanker in de huid bestuderen) zal naast met tamoxifen ook met TPA/DMBA (chemische carcinogenese) behandeld worden, DMBA behandeling is eenmalig, TPA behandeling is daarna wekelijks tot er tumoren ontstaan. Dieren zullen regelmatig worden geschoren om topische toediening te faciliteren. Tijdens de behandeling zullen deze laatstgenoemde dieren nauwlettend gevolgd worden op het ontstaan van huidtumoren. Ook voor deze experimenten zullen we in eerste instantie 15 dieren per cohort inzetten als pilotcohort, waarna we bepalen of er verschillen waarneembaar zijn tussen experiment en controledieren. Zo ja (Go), dan zullen we hiervan een compleet cohort maken door maximaal 35 extra dieren in te zetten (dus 50 in totaal). Als er in de pilot geen of te kleine verschillen zijn tussen de groepen, zullen we geen extra dieren gebruiken voor het betreffende pilotcohort (No-Go).

Voor deelvraag c) zullen we om de groeisnelheid van aneuploide tumoren te vergelijken met niet aneuploide tumoren muizen injecteren met aneuploide kankercellen of niet aneuploide kankercellen. Hiervoor zullen we aneuploide en niet aneuploide tumorcellen isoleren uit onze muismodellen voor T-ALL. Deze tumorcellen zullen we labelen met een genetische fluorescente reporter om ze in vivo te kunnen traceren met de IVIS imager. Op deze wijze kunnen we volgen of de donor dieren tumoren ontwikkelen. Dieren worden opgeofferd als we een tumor waarnemen (IVIS) en tumorcellen worden dan getransplanteerd in ontvanger dieren, zodat we de groeisnelheid (het ontstaan van de tumor in de recipient) kunnen vergelijken tussen aneuploide en niet aneuploide tumoren. We zullen deze methode eerst testen op een pilotcohort van 15 dieren en indien we de groeisnelheid betrouwbaar kunnen meten, dan zullen we het cohort uitbreiden tot MAXIMAAL 50 dieren of tot het aantal dieren waarbij we significante verschillen hebben gemeten tussen de experiment en controle dieren. Indien we voorzien dat we geen significante verschillen kunnen meten in een cohort van 50 dieren, dan beschouwen we het verschil als biologisch niet significant en zullen we niet meer dieren dan de pilot gebruiken (15, No-Go).

Daarnaast zullen we kandidaatgenen die samen met aneuploidie leiden tot hematologische kankers (te vinden in de onder a beschreven transposonscreen in bloed) valideren middels transplantaties van aneuploidie bloedcellen die retroviraal/lentiviraal getransduceerd zijn met kandidaatgen cDNAs of RNAis. Deze experimenten zullen dus pas plaatsvinden (Go) als we kandidaatgenen uit de transposonscreens geïdentificeerd hebben en niet worden uitgevoerd als geen van de transposonscreens werkt (No-Go). Voor de in vivo validatie van kandidaatgenen worden longterm en shortterm hematopoietische stamcellen uit onze conditionele knockuit muizen geïsoleerd (te verkrijgen via dierproeftype 1). Deze cellen worden in kweek getransduceerd met kandidaatgenen (maximaal 5 transplantaties per gen) en Cre-reporter en daarna in immuno-compromised ontvangermuizen getransplanteerd. Dieren (maximaal 5 per te testen gen, zie ook onder motivering dieraantallen) worden dan gevolgd op de ontwikkeling van maligniteiten.

Verder zullen we kandidaatgenen valideren gevonden in de transposonscreens die leiden tot solide tumoren (darm, huid, hersenen). Aangezien dit solide tumoren zijn, zullen deze kandidaatgenen in hechtende relevante cellijnen getransduceerd worden (cDNA/RNAi, CRISPR) en subcutaan geïnjecteerd worden. Dieren worden dan gevolgd voor de vorming van subcutane tumoren (1 flank experiment, 1 flank controle) en opgeofferd als de tumoren >1 cm worden. Ook hier zullen we maximaal 5 dieren per te valideren gen gebruiken.

Tenslotte zullen we een aantal dieren gebruiken om de genomische instabiliteit en/ of frequentie van chromosoommissegregatie in getransplanteerde tumoren te quantificeren. Primaire tumorcellen zullen hiertoe worden getransplanteerd in immuno-compromised hosts. Muizen worden dan gevolgd op de ontwikkeling van maligniteiten (bloed of subcutaan) en opgeofferd om te meten hoe heterogeen de tumoren zijn. Per te analyseren tumor zullen we maximaal 5 dieren met de primaire tumor transplanteren.

---

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

In de meeste gevallen kennen we de latentie van de fenotypes/pathologie van de voren niet. Onze uitgebreide ervaring heeft ons geleerd, dat cohorten van 40-50 dieren per genotype voldoende zijn om een statistisch significant verschil aan te tonen tussen controle-groepen en dieren met een genetische predispositie (aneuploidie). In sommige gevallen blijken te verschillen tussen controlegroepen en experimentgroepen zo groot dat een kleiner aantal dieren volstaan had om het verschil in overleving/tumorlatentie significant aan te tonen. Om tot het minimum aantal noodzakelijke dieren te kunnen komen, zullen we daarom altijd starten met een pilotcohort van dieren (15 per groep) en deze alleen uitbreiden tot 50 dieren als er meetbare verschillen zijn tussen experiment en controledieren (Go) na overleg met de IvD. Als we geen duidelijk verschillen in een van de pilotcohorten meten zullen we het betreffende

cohort niet uitbreiden (no-Go) en concluderen dat er geen significante biologische verschillen meetbaar zijn.

In geval het volledige cohort van 50 dieren noodzakelijk is om de een significant verschil te meten zullen alle dieren (dus pilot van 15 en 35 extra dieren) als 1 experimentgroep beschouwd worden. Correctie voor multiple testing is dan ook niet noodzakelijk. Belangrijk hiervoor is wel, dat omdat alle experimenten survival curves zijn, we weinig variatie in de overleving verwachten tussen de pilot en eventueel noodzakelijke uitgebreidere cohorten. In eerste instantie dienen de eerste 15 dieren echt als pilot: we gaan ervan uit (op basis van voorgaande kennis) dat 15 dieren niet voldoende is om een significant verschil tussen dieren aan te tonen. Omdat de genotypes die we testen een onbekend fenotype hebben, kunnen we niet 100% voorspellen wat het verschil in overleving zal zijn. Mocht dit verschil groter zijn dan hier ingeschat, dan zullen we post-hoc een nieuwe power analyse uitvoeren met de dan nieuw bekende gegevens (i.e. het verschil in overleving tussen de groepen en de verdeling van experimentwaardes) om zo vast te stellen of de 15 dieren voldoende zijn voor een statistisch significant verschil of dat er nog meerdere dieren noodzakelijk zijn.

In geval van transposon screens zullen we een cohort van 100 experimentdieren volgen, waarin we transposons mobiliseren in aneuploid weefsel, en 50 controledieren, waarin we transposons mobiliseren in niet aneuploide weefsel. Deze cohortgrootte wordt bepaald door het aantal dieren noodzakelijk om genomewide de belangrijkste terugkomende integratie sites - common insertion sites of CIS - te identificeren. In elke tumor zullen op basis van sequencing de meest belangrijke integratiesites worden geïdentificeerd. Zo vinden we in elke tumor de zogenaamde 'driversmutaties' van de tumor. Omdat elke tumor 'uniek' is, zullen we daarna de integratiesites vergelijken binnen alle tumoren in het totale cohort. Op deze wijze kunnen we uitvinden welke drivermutaties vaker voorkomen binnen het cohort. Deze steeds terugkomende integratiesites (de CIS) zijn mogelijke specifieke drivers voor aneuploide tumoren en dus de kandidaatgenen die van aneuploide cellen aneuploide kankercellen maken. Onze ervaring en daarnaast de uitgebreide ervaring van onze collega's met dit type transposonscreen (zie ook (Rad et al, Nat. Gen. 2015 Jan;47(1):47-56) heeft uitgewezen dat met deze hoeveelheden dieren de meest belangrijke common insertion sites worden gevonden: de CIS worden dan voldoende vaak gevonden in de cohorten om zeker te zijn dat de belangrijkste drivers in dit type studie dan gevonden zijn.

Belangrijk om nogmaals te benadrukken is dat we deze screens sequentieel zullen uitvoeren te beginnen met het hematopoïetisch systeem. Alleen als blijkt dat een groot aantal hits in de eerste screen weefselsspecifiek is, zullen we een screen in een volgend weefsel uitvoeren (zoals beschreven onder B). Na een tweede screen zullen we de overlap tussen de eerste twee screens bekijken en op basis daarvan beslissen of we in een derde en/ of vierde weefsel gaan screenen. We zullen daarnaast ook altijd beginnen met een pilotscreen om te kijken of er daadwerkelijk transposons-geïnduceerde tumoren ontstaan in het te onderzoeken weefsel.

Belangrijk: ook beschouwd vanuit een power-analyse is 40-50 dieren per cohort een reële schatting: in ons geval is de variatiecoëfficiënt sigma vooraf niet bekend; de proefgrootte wordt daarom afgelezen van een uit Owen afgeleide grafiek (Proefdieren en Dierproeven, L.F.M van Zutphen, vijfde druk, 2009, blz 211). Op basis van een onbetrouwbaarheidsdrempel (alfa) van 0.05 of een power ( $\pi$ ) van  $> 0.8$  en een verhouding tussen het te meten verschil ( $\mu_1 - \mu_2$ ) en variatiecoëfficiënt van ongeveer 0.7 (dit betekent dat er bij een spreiding van bijvoorbeeld 2 maanden in de overleving binnen 1 groep een significant verschil gemeten wordt als de gemiddelde overleving tussen experiment en controlegroep 1.5 maanden uit elkaar ligt; dit zijn reële waarden die we in de praktijk vaak waarnemen) valt er uit de grafiek af te lezen dat de proefgrootte ongeveer 40-50 dieren dient te zijn.

---

## **B. De dieren**

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

---

Alle experimenten zullen worden uitgevoerd op volwassen muizen. We maken gebruik van zowel mannen als vrouwen, tenzij we in de mamma kijken, dan gebruiken we alleen vrouwen. We verwachten namelijk geen sexe specifieke effecten. Voor dit type dierproef zullen alleen volwassen muizen uit eigen fok (heel soms bestellen we dieren vanuit extern, zoals van ██████ gebruikt worden, in sommige gevallen zullen dieren als jong volwassene al behandeld worden op Cre te activeren.

2a)

Voor de transposonscreens (bloed, huid, cerebellum en darm):

We zullen MAXIMAAL in 4 weefsels transposonscreens uitvoeren (te beginnen in bloed), zie hierboven voor fasering en Go/No-Go keuzes. Hiervoor hebben we per weefsel maximaal 100 experiment dieren en 50 controledieren (transposons zonder aneuploidie) per weefsel nodig.

Subtotaal transposonscreens: 600 dieren

Voor de CRISPR screen zullen we 2 pilot cohorten (in hersenen en mamma) uitvoeren van 15 dieren elk. Voor een van deze weefsels (afhankelijk van de uitkomst van de pilot) zullen we een volledige screen doen (ook 100 dieren + 50 controledieren (transposons zonder aneuploidie)). Bij de volledige screen zullen we de 15 dieren van de pilot voor het uiteindelijk gekozen weefsel meenemen in het totaal aantal experiment dieren (100).

Subtotaal CRISPR screen: 165 (150 voor volledige screen inclusief de dieren in een van de pilots + 15 dieren in andere pilot die niet in volledige screen uitmond).

2b)

Aneuploide lymfocyt cohorten; T-cel specifiek en geheel bloed:

Experiment aneuploid T-cel lymfocyt cohort: 50 dieren met aneuploid T-ALL, niet aneuploid controle T-cel lymfocyt cohort: 50 dieren

Experiment aneuploid bloedkanker cohort: 50 dieren, niet aneuploid controle bloedkanker cohort: 50 dieren

Subtotaal bloed: 200 dieren

Aneuploide medulloblastoma cohorten: In deze cohorten combineren we aneuploidie met een aantal bekende medulloblastoma predisposities in 4 verschillende combinaties van aneuploidie met of zonder ██████ verlies en met of zonder Myc overexpressie.

Per cohort testen we maximaal 50 dieren. Te testen genotypes: aneuploidie +Myc (50 dieren); aneuploidie + ██████ verlies (50 dieren); controle tumoren: Myc (50 dieren) en ██████ verlies (50 dieren)

Subtotaal brein 200 dieren

Aneuploide squamous cell carcinoma en basal cell carcinoma cohorten: Voor basal cell carcinoma testen we een genetisch model (aneuploide gecombineerd met Ptch1 verlies) en chemische carcinogenese. Voor squamous cell carcinoma testen we alleen een genetisch model (aneuploide gecombineerd met ██████ verlies).

Voor basal cell carcinoma testen we 3 cohorten (2 experimenteel (aneuploide tumoren), 1 controle (niet aneuploide tumoren) van maximaal 50 dieren en voor squamous cell carcinoma 2 cohorten van maximaal 50 dieren (1 experimenteel (aneuploide tumoren), 1 controle (niet aneuploide tumoren), dus in totaal 5 cohorten.

Subtotaal huid: 250 dieren

Aneuploide hepatocellulair adenoma/carcinoma:

Experiment aneuploide levertumoren: 50 dieren, controle niet aneuploide levertumoren: 50 dieren  
Subtotaal lever: 100 dieren

Mammatumoren (WAP-Cre):  
Aneuploide mammatumoren: 50 dieren, niet aneuploide controle mammatumoren: 50 dieren  
Subtotaal mamma: 100 dieren

Darmkanker: Voor het modelleren van darmkanker zullen we twee verschillende combinaties van aneuploidie met verschillende predisposities (RasV12, p53, APC) en twee controle cohorten testen met maximaal 50 dieren per cohort. Te testen: RasV12 tumoren (controle, 50 dieren) vs. RasV12+ aneuploidie (experiment (50 dieren)); █████ verlies (controle tumoren; 50 dieren) en █████ verlies met aneuploidie (experiment; 50 dieren).  
Subtotaal darm: 200 dieren

Daarnaast genereren we ook enkele nieuwe conditionele modellen voor chromosomale instabiliteit (zoals beschreven in dierproeftype 1). Naast dat we onder dierproeftype 1 in deze modellen zullen kijken wat de effecten van de genmutaties zijn op aneuploidie in de muis, zullen we ook kijken of deze mutaties inderdaad leiden tot aneuploide kanker. Hiertoe zullen we in eerste instantie de mutaties activeren in het bloed (waar de tumorigenese in de muis in het algemeen het snelst verloopt) en misschien in huid. Omdat we deze kandidaatgenen nog in celkweek aan het testen zijn, weten we de gennamen hiervan nog niet. We verwachten de komende 5 jaar ongeveer 4 van deze modellen te genereren (zie ook onder dierproeftype 1). Per gen zullen we 1 tumorpredispositie (█████ testen) in T-cellen. Het T-cel lymphoma controle tumorn cohort (█████ verlies gedreven T-ALL; zie hierboven) dubbelt hier als controle. Per gen vragen we dan ook 50 dieren aan in dit type dierproef dus 200 in totaal.  
Subtotaal nieuw te testen genen: 200 dieren

2c)  
Meten groeisnelheid aneuploide tumoren: ██████████; in T-cellen)

Om te meten of aneuploide tumoren sneller of langzamer groeien dan niet aneuploide tumoren, zullen we aneuploide tumoren isoleren uit onze twee modellen (██████████) voor aneuploide T-ALL. Deze tumoren zullen we transplanteren in recipient muizen en meten hoe lang het duurt voordat deze tumorcellen een nieuwe tumor vormen in vergelijking met een transplantatie van een niet aneuploide tumor. Per genotype (3 in totaal) hebben we 50 donor dieren en 50 recipient dieren nodig, 300 in totaal. Voor 2 genotypes, ██████████ en ██████████; p53 (100 dieren totaal) kunnen we de donor tumorcellen isoleren uit dieren die we ook onder 2b (aneuploide T-cel tumoren) nodig hebben (vermindering).  
Subtotaal: 200 dieren

Valideren rol kandidaatgenen (uit 2a) in maligne transformatie van aneuploide cellen naar aneuploide kankercellen  
We verwachten ongeveer 10 genen per weefsel (voor maximaal 4 weefsels in totaal: huid, cerebellum, darm, bloed) in vivo te moeten valideren (het merendeel van de kandidaatgenen valt af op basis van eerste in celkweek validatie). Hiervoor moeten we 5 experiment (aneuploidie + kandidaatgen) en 5 controledieren (alleen kandidaatgen) per gen testen.  
Subtotaal: 4 weefsels, 10 genen per weefsel, 10 dieren per gen = 400 dieren

Meten chromosomale instabiliteit en aneuploidie in tumoren:  
We willen voor maximaal een 20 tumoren (10 aneuploide (experiment transplantaties) en 10 niet aneuploide (controle transplantaties)) het verloop van

chromosomale instabiliteit in ontwikkelende tumoren onderzoeken. Per tumor zullen we maximaal 5 muizen injecteren. We hebben hiervoor maximaal 100 dieren nodig.

Subtotaal aneuploidie metingen: 100 dieren.

Voor de in dit dierproeftype beschreven experimenten zullen we een aantal nieuwe muizenstammen genereren. We verwachten geen ongerief in de fok van deze dieren, maar omdat we dit van te voren niet kunnen uitsluiten gelden de eerste twee generaties als fok met ongerief. Per genotype zetten we over het algemeen twee fokparen in, die we elk twee nestjes laten krijgen. Hiermee is een voldoende aantal dieren te krijgen om de juiste genotypes af te leiden en krijgen we voldoende dieren om met grote zekerheid vast te stellen dat de nakomelingen geen ongerief ondervinden. Per nieuw te genereren stam vragen we daarom 4 nesten (2 nesten per genotype, 2 generaties) nakomelingen met gemiddeld 12 pups, dus 48 dieren aan. Voor de hierboven beschreven cohorten zullen we in totaal 30 nieuwe genotypes genereren.

Subtotaal fok met ongerief:  $30 \times 48 = 1440$  dieren.

Totaal: 4155 dieren

---

### **C. Hergebruik**

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

---

### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

Waar mogelijk doen we onze experimenten met celkweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celkweek vaak anders op aneuploidie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploidie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploidie in diermodellen te onderzoeken.

De nieuw te testen kandidaatgenen voor chromosomale instabiliteit zullen we eerst in weefselkweek testen, zodat alleen relevante genen in de muis getest worden (vervanging en vermindering).



Verder gebruiken we controlecohorten en het materiaal van dierproeftype 1 in dit dierproeftype voor de analyse van de effecten van aneuploïdie op niet en wel getransformeerde weefsel: in dierproeftype 1 testen we de effecten van aneuploïdie voor dezelfde weefsels als in dierproeftype 2, maar in dierproeftype 1 in een niet-kanker setting. De fenotypes van deze cohorten en te isoleren weefsels fungeren naast primair onderzoeksdoel in dierproeftype 1 ook als ongetransformeerde weefsel controle in dit dierproeftype. Deze controle voeren we toech maar 1 keer uit, wat leidt tot een vermindering van het aantal dieren.

In de keuze van onze weefsels die we onderzoeken, hebben we met name gekozen voor weefsels waarin tumoren snel opgemerkt worden en daarnaast en daarom tot relatief weinig ongerief leiden (verfijning). Door waar mogelijk pilotexperimenten te doen alvorens gehele cohorten te volgen kunnen experimenten waarbij geen significant verschil meetbaar is, worden voorkomen (vermindering). Daarnaast zullen we de transposonexperimenten gefaseerd uitvoeren en na elk experiment bekijken of we in meer weefsels willen kijken wat mogelijk leidt tot vermindering.

Verder maken we gebruik van het genetisch fluorescent labelen van tumoren waar mogelijk, zodat we tumoren kunnen opsporen voor ze tot ernstig ongerief leiden (verfijning) en verschillende tumorstadia in kaart kunnen brengen door dezelfde muizen vaker te meten (vermindering).

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

Dieren in tumorcohorten worden minimaal 2 maal per week nauwkeurig geïnspecteerd op tekenen van ongerief. Gaande onze voortgang zullen we beter weten wanneer dieren ziek worden en rond die periode zullen we de waarnemingen intensiveren. Dieren zullen worden opgeofferd zodra ze de eerste tekenen van tumoren of ander ongerief vertonen zodat ongerief tot een minimum beperkt wordt. Hiertoe worden dieren dagelijks geïnspecteerd door medewerkers van de dierverzorging en minimaal 2 maal per week door de verantwoordelijke onderzoeker.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

Deze proeven zijn nog niet eerder uitgevoerd. Hiervoor hebben we een uitgebreide zoekopdracht op PubMed uitgevoerd en daarnaast gesproken met onze diverse collega's die dit soort modellen ontwikkelen [REDACTED]

## 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.

Dieren zullen bij eerste tekenen van ongerief/pljn worden opgeofferd.

Ja

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

In dit dierproeftype zullen muizen beginnende tumoren ontwikkelen, die mogelijk tot matig ongerief kunnen leiden. Hieronder staat beschreven voor de verschillende type weefsels hoe dit ongerief zich kan uiten.

- In geval van leukemie (experimenten onder vragen 2a, 2b en 2c) zullen dieren last krijgen van anemie, kortademigheid, witte oren, mogelijk vergrootte milt, lymfeklieren en/of thymus. Dieren worden opgeofferd bij de eerste tekenen hiervan, zodat het ongerief 'matig' niet overschreidt.
- In geval van medulloblastoma (cerebellum) zullen dieren mogelijk last krijgen van motorische afwijkingen door het medulloblastoom. Door gebruik te maken van non-invasieve imaging verwachten we dieren te kunnen opofferen voor dat deze zich manifesteren. Het ongerief van medulloblastoma wordt ingeschat als matig.
- In geval van huidtumoren (basal and squamous cell carcinoma, vragen 2a en 2b) kan er ongerief optreden door plaatselijke jeuk op de plek van de tumor. Dieren zullen worden opgeofferd voordat ze last krijgen van de tumoren (tumorgrootte tot 1 cm). Het ongerief van deze tumoren wordt ingeschat op licht tot matig.
- In geval van levertumoren (vraag 2b) zullen dieren uiteindelijk gewicht gaan verliezen. Door gebruik te maken van non-invasieve imaging verwachten we de tumoren in een vroeg stadium te kunnen diagnostiseren en dieren tijdig opofferen. Het ongerief wordt ingeschat als matig.
- In geval van mammatumoren (vraag 2b) zullen dieren ongerief ondervinden van een onderhuidse massa. Dieren zullen eens per twee weken onderzocht worden op de aanwezigheid van mammatumoren middels palpatie. We verwachten daarmee de tumoren vroegtijdig op te sporen. Bij tumoren > 1cm zullen

dieren worden opgeofferd. Het ongerief schatten we in als licht-matig.

- In geval van darmtumoren (vragen 2a, 2b) zullen dieren mogelijk vermageren door minder efficiënte voedselopname. Dieren zullen daarom regelmatig (eens per 2 weken) worden gewogen om zo te voorkomen dat dieren meer ongerief dan noodzakelijk ondervinden van deze tumoren. Het ongerief voor deze dierproef wordt ingeschat als matig.

In zeer zeldzame gevallen kan het zo zijn dat de hierboven beschreven tumoren eerder of sneller ontstaan dan we verwachten (in het begin van de studie). Deze enkele dieren (verwacht <5% van de dieren) zouden dan direct (op basis van humane eindpunten) moeten worden opgeofferd. Het ongerief voor deze dieren schatten we in als matig (zie ook humane eindpunten), gezien de dieren tijdig opgeofferd worden. Uiteraard passen we onze proefopzet dan wel aan in overleg met de IvD (door bijv. eerder of vaker non-invasieve imaging toe te passen).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Voor alle te bestuderen weefsels wordt het ongerief veroorzaakt door beginnende tumoren in de betreffende weefsels:

- Motorische afwijkingen zijn het gevolg van verdrukking van het cerebellumweefsel door de tumor
- Anemie en kortademigheid komen door verminderde aanmaak van rode bloedcellen door leukemie en eventueel door een vergrootte thymus die op de longen drukt.
- Gewichtsverlies bij lever of darmtumoren komt door een verminderd efficiënte vertering/opname van voedsel.
- Jeuk bij huidtumoren wordt veroorzaakt door lokale ontstekingen rondom de huidtumor.
- Tenslotte kunnen dieren algehele malaise ontwikkelen door weefselfalen: dit zullen we echter in verrewé de meeste gevallen ruim voor zijn door de dieren regelmatig te inspecteren en non-invasieve imaging.

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

Dieren zullen zeer regelmatig (minimaal 2 maal per week) uitgebreid geïnspecteerd worden door de verantwoordelijke onderzoeker en worden dagelijks door de dierverzorging gecontroleerd. De onderzoekers zullen de inspecties intensiveren als dieren in de periode komen dat de tumoren zich gaan ontwikkelen. Het ontstaan van tumoren zal waar mogelijk ook gevolgd worden met fluorescente reporters en non-invasieve imaging.

Dieren zullen worden opgeofferd zodra ze licht of matig ongerief ondervinden (motorische problemen, kortademigheid, zichtbare of palpeerbare tumoren, kromme rug, etc). Verder worden dieren opgeofferd als ze lethargisch zijn, meer dan 20% gewicht verloren zijn, of ernstige verwondingen (vechten, krabben) hebben (zie ook humane eindpunten).

## **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.

Doordat we de dieren regelmatig controleren en dit intensiveren in de periode dat de dieren ziek worden, zal alleen in de minderheid van de gevallen dieren dusdanig ziek worden dat de op basis van humane eindpunten opgeofferd dienen te worden, in onze ervaring is dit in minder dan 5% van de gevallen. Dit zal zijn als de dieren moribund zijn, significante motorische afwijkingen hebben (omvallen, meerdere malen epileptische aanvallen krijgen (cerebellum model)) lethargisch zijn (kan optreden bij weefselfalen in bijv. laat levertumor stadium, ademnood vertonen (ernstige anemie, of grote druk op de longen door vergrootte thymus (>1.5 g)), >20% van hun gewicht verloren zijn (kan optreden bij lever- of darmtumoren) of ernstige (vecht)wonden (kan optreden na

vechten of openkrabben huidtumoren) hebben.

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

We streven ernaar dat zo min mogelijk dieren dit criterium zal halen, we verwachten minder dan 5% van de dieren op basis van onze voorgaande experimenten.

#### **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 cumulatief ongerief schatten we in als licht-matig. 35% van de dieren zal licht ongerief ondervinden (dieren t.b.v. het genereren van nieuwe lijnen) en 65% van de dieren zal matig ongerief ondervinden (dieren die tumoren ontwikkelen of opgeofferd worden op basis van humane eindpunten).

### **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.

Dieren zullen uitgebreid worden onderzocht op macroscopische pathologie en weefels zullen worden opgestuurd voor histologie, zie ook de hierboven beschreven te meten uitkomstparameters. Verder zullen aangedane organen worden opgeslagen voor verder onderzoek (eiwit, RNA, DNA, aneuploidiemetingen, en transposonintegratiebepaling)

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.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  |
|--------------------------------|---|
| <input type="text" value="3"/> | <input type="text" value="Muismodellen voor het visualiseren van aneuploidie en chromosoomsegregatie"/> |

*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.

In dit type dierproef zullen we in levende muizen chromosoommissegregatie en aneuploïdie visualiseren. Dit is belangrijk, omdat ons voorgaand werk laat zien dat aneuploidie (zoals onderzocht in de eerste twee dierproeftypes) in vivo beter getolereerd wordt dan we eerder aannamen. In dit dierproeftype willen we chromosoomsegregatie visualiseren middels intravital imaging, gebruikende van de diermodellen uit dierproeftype 1 en 2 die we inkruisen met nieuw te genereren muismodellen in samenwerking met ██████████. In deze te ontwikkelen muismodellen kunnen we diverse structuren van mitotische cellen genetisch fluorescent labelen. Deze te gegenereerde conditionele muismodellen voor mitotische structuren zullen in eerste instantie worden ingekruisd met onze bestaande modellen voor weefsel-specifieke aneuploidie beschreven onder dierproeftypes 1 en 2) We zullen in eerste instantie

ons richten op het imageren van de huid, maar in tweede instantie mogelijk ook in andere orgaansystemen (bijv. darm) bekijken. Hiertoe zullen we onze nieuwe te genereren 'mitosemarker muizen' inkruisen met enkele van onze bestaande stammen. Indien nodig, zullen we celdeling (of zelfs tumoren) induceren (genetisch dan/wel chemisch), zoals beschreven in dierproef type 2 in deze aneuploide mitosemarker muizen. Dieren zullen dan een intravital imaging window geïmplementeerd krijgen in huid of buikwand en dan onder verdoving gefixeerd worden onder een multi-photon microscoop opstelling zodat we individuele cellen kunnen volgen.

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.

Aneuploide en niet aneuploide mitotische marker dieren zullen window chambers geïmplementeerd krijgen, al dan niet na inductie van celdeling met TPA (2 x per week, enkele weken voorafgaande aan het imaging experiment; of DMBA (1x) + TPA, 2 keer per week totdat er tumoren ontstaan). DMBA (7,12-dimethylbenz[a]anthracene) dient als mutagen om mutaties in de huid aan te brengen, TPA (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) leidt tot een ontstekingsreactie en daarmee celdeling tot celdeling: deze tweestaps carcinogenese is een efficiënte manier om huidtumoren in de muis te provoceren (Filler et al, CSH Protoc. 2007 Sep 1;2007:pdb.prot4837). DMBA en TPA zullen topisch worden aangebracht volgens een standaard huidmutagenese protocol (Filler et al, CSH Protoc. 2007 Sep 1;2007:pdb.prot4837). Door dit protocol treedt er alleen mutagenese lokaal in de huid op.

Voor imaging zullen de dieren gesedateerd worden en onder sedatie voor enkele uren gefixeerd worden onder de microscoop om individuele celdelingen te visualiseren en aneuploidie te quantificeren in vivo. De exacte protocollen zullen worden overgenomen van en geleerd bij het lab [REDACTED]

[REDACTED] heeft protocollen waarbij de window chambers meerdere weken goed blijven zitten zonder ongerief voor de muizen: deze protocollen zullen we leren van de biotechnici bij [REDACTED] en hier implementeren.

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

Per weefseltype en genotype (eventueel met/zonder behandeling, zie toelichting dieren) zullen we maximaal 10 dieren monitoren, met maximaal 4 metingen per dier met minimaal 1 week tussen de individuele metingen. In deze opzet krijgen we in totaal per genotype 40 metingen (4 per dier, 10 dieren totaal), wat voldoende is om biologische verschillen significant aan te tonen: zie ook statistische toelichting onder dierproef types 1 en 2). Per genotype zullen we tot 2 types mitosemarker-muizen testen (met verschillende kleurcombinaties, verschillende (mitose) markers), daarom vragen we 20 dieren per genotype aan. We zullen ons in eerste instantie richten op imaging in de huid en darm (2 goed toegankelijke weefsels) en indien succesvol (Go) in tweede instantie ook op imaging van de mamma, en daarna mogelijk ook de lever.

In de aanloop zullen we 20 dieren gebruiken om de intravital imaging methodieken te leren ([REDACTED]) en te optimaliseren. We zullen pas de 'echte metingen' starten als we de imaging methodiek geoptimaliseerd hebben (Go), maar zijn vrij zeker dat dit zal lukken, omdat dit type imaging al routinematig gedaan wordt in het [REDACTED]

## **B. De dieren**

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

Alle experimenten zullen worden uitgevoerd op volwassen transgene muizen. We maken gebruik van mannen en vrouwen, omdat we geen verschillen verwachten tussen de sexes. Voor dit type dierproef zullen alleen volwassen muizen uit eigen fok (heel soms bestellen we dieren vanuit extern, zoals van [REDACTED]) gebruikt worden, in sommige gevallen zullen dieren als jong volwassene al behandeld worden op Cre te activeren. Binnen dit type dierproef

zullen we de volgende cohorten volgen:

Optimaliseren imaging (mitose-marker): 20 dieren  
Subtotaal 20 dieren

Huid:

Controle muizen; 2 te testen mitose-markers: 20 dieren  
Aneuploide muizen; 2 te testen mitose-markers: 20 dieren  
Controle muizen; inductie celdeling met TPA; 2 te testen mitose markers: 20 dieren  
Aneuploide muizen; celdeling inductie met TPA; 2 te testen mitose markers: 20 dieren  
Controle muizen; huidtumor inductie met DMBA/TPA; 2 te testen mitose markers: 20 dieren  
Aneuploide muizen; huidtumorinductie met DMBA/TPA, 2 te testen mitose markers: 20 dieren  
Subtotaal 120 dieren

Darm:

Controle muizen, 2 te testen mitose markers: 20 dieren  
Aneuploide muizen, 2 te testen mitose markers: 20 dieren  
Subtotaal 40 dieren

Indien imaging in huid en darm succesvol is zullen we ook nog in mamma en/of lever kijken. We hebben dan de bestaande mitosemarkers goed geanalyseerd en gebruiken hier dan alleen de meest geschikte mitosemarkermuis. We hebben hier dan 20 dieren per weefsel, 10 experiment, 10 controle voor nodig. Deze experimenten vinden plaats in nauw overleg met en met advies van [REDACTED].  
Subtotaal 40 dieren.

Om alternatieven voor intravital imaging dierproeven te exploreren zullen we vanuit een aantal dieren organoids afleiden uit de darm en cerebellum. Hiervoor zullen we maximaal 10 reporterdieren opofferen per genotype voor 4 genotypes in maximaal 2 weefsels: 2 mitosemarkers, 10 experiment (genotype 1) en 10 controle (genotype 2) dieren: 80 dieren totaal. Deze organoids zullen we dan imagen als alternatief voor het imagen in dieren. Dit experiment kan aanleiding vormen om in een vervolgaanvraag meer experimenten in organoids te doen en minder in dieren.  
Subtotaal 80 dieren

Subtotaal imaging: 300 dieren.

Voor deze experimenten zullen we een aantal nieuwe muizenstammen genereren. Dit betreft stammen waarin we weefsel-specifiek diverse fluorescent gelabelde mitosemarkers tot expressie kunnen brengen. Deze nieuw te genereren mitosemarkermuizen (worden gegenereerd door [REDACTED] worden dan ingekruist met stammen beschreven onder dierproeftype 1 en 2 (muismodellen voor weefsel-specifieke aneuploidie en aneuploide kanker; huid, lever, cerebellum, mamma en darm), dit zijn de nieuw te genereren stammen. We verwachten geen ongerief in de fok van deze dieren, maar omdat we dit van te voren niet kunnen uitsluiten gelden de eerste twee generaties als fok met ongerief. Per genotype zetten we over het algemeen twee fokparen in, die we elk twee nestjes laten krijgen. Hiermee is een voldoende aantal dieren te krijgen om de juiste genotypes af te leiden en krijgen we voldoende dieren om

met grote zekerheid vast te stellen dat de nakomelingen geen ongerief ondervinden. Per nieuw te genereren stam vragen we daarom 4 nesten (2 nesten per genotype, 2 generaties) nakomelingen met gemiddeld 12 pups, dus 48 dieren aan. Voor de hierboven beschreven cohorten zullen we ongeveer 10 nieuwe genotypes genereren.

Subtotaal fok met ongerief:  $10 \times 48 = 480$  dieren.

Totaal aangevraagd voor dierproeftype 3: 780 dieren.

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

### D. Vervanging, vermindering en verfijning

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

Waar mogelijk zullen we i.p.v. dieren organoids (dus in weefselkweek) imagen (vervanging, vermindering) en bekijken of we in de toekomst meer met organoids kunnen als vervanging van dierproeven. Dieren zullen passende pijnstilling krijgen waar noodzakelijk (verfijning). Verder zullen we dezelfde dieren meerdere malen bekijken, wat dus leidt tot vermindering van het aantal proefdieren. Tenslotte zullen we de minst invasieve window chambers gebruiken: verfijning.

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.

Gedurende het feitelijke imagen onder de microscoop (enkele uren) zullen de muizen gesedeerd zijn, zodat ze geen ongerief ondervinden van het imagen. Dieren zullen tijdens en na de operatie van passende pijnstilling voorzien worden. Tenslotte zullen de dieren met imaging chambers nauwgezet gevolgd worden op de eventuele ontwikkeling van complicaties van de window chamber (lokale ontsteking) en hiervoor behandeld worden en opgeofferd worden indien dit te ernstig is/ niet behandelbaar is. De ervaring van [REDACTED] leert dat de imaging chambers zonder ongerief meerdere weken blijven zitten.

## Herhaling en duplicering



### E. Herhaling

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

Deze proeven zijn nog niet eerder uitgevoerd. Hiervoor hebben we een uitgebreide zoekopdracht op PubMed uitgevoerd en daarnaast gesproken met onze diverse collega's die dit soort modellen ontwikkelen [REDACTED]  
[REDACTED]

## 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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Alle dieren onder dit dierproeftype (behalve de dieren die worden opgeofferd voor organoids) ondervinden ongerief (licht) van de ingreep om het imaging window te implanteren en er mee rond te lopen. Deze procedure leren we van het lab van [REDACTED]. In enkele gevallen kan rondom het imaging window een ontsteking ontstaan. Deze kan in eerste instantie lokaal behandeld worden met antibioticum en als dit niet werkt zal het dier worden opgeofferd.

Verder zal een deel van de dieren huidtumoren ontwikkelen (deze kunnen jeuk geven) of darmtumoren ontwikkelen (die kunnen leiden tot gewichtsverlies). In geval de intravital imaging succesvol is, zullen we ook imaging pilots uitvoeren op mamma en levertumoren. Deze dieren kunnen beginnend ongerief ondervinden van lever/mamma tumoren (gewichtverlies). Het ongerief van de verschillende type tumoren wordt ingeschat als matig. Het cumulatief ongerief van de intravital imaging (window implantatie, tumor en sedatie voor imaging) wordt ingeschat als matig.

Voor de organoid experimenten zullen dieren worden opgeofferd als ze beginnende darmtumoren of beginnend medulloblastoma hebben. Het ongerief voor deze dieren wordt ingeschat als matig.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

De chirurgische ingreep leidt tot licht ongerief. Als er een ontsteking ontstaat bij het imaging window schatten we het cumulatief ongerief in als matig. De ontstane tumoren kunnen aanleiding geven tot matig ongerief: huidtumoren leiden tot jeuk, darmtumoren leiden tot verminderde voedselopname en gewichtsverlies, levertumoren kunnen leiden tot verstoorde voedselvertering en dus gewichtsverlies, mammatumoren kunnen dieren beperken in hun beweging, cerebellumtumoren (medulloblastoma voor de organoids) kan tot motorische afwijkingen leiden door verdrukking van het gezonde cerebellumweefsel. De combinatie van imaging en tumoren schatten we in als matig ongerief.

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

Dieren met imaging windows zullen om de dag geïnspecteerd worden door onderzoekers en dagelijks door dierverzorgers om te controleren of er geen ontstekingen ontstaan. Gedurende het feitelijke imageren (immobilisatie onder de microscoop, enkele uren) worden dieren constant in de gaten gehouden om te waarborgen dat ze goed verdoofd zijn en geen ongerief ondervinden. Dieren waarin tumoren kunnen ontstaan worden minimaal 2 maal per week uitgebreid gecontroleerd en daarnaast regelmatig gecontroleerd middels non-invasieve IVIS imaging. Op deze wijze kunnen we dieren imageren op het moment dat de tumoren goed waarneembaar zijn (microscopisch), maar nog niet veel ongerief geven.

## **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 de minderheid van de gevallen (<5%) zullen dieren dusdanig ziek worden dat de op basis van humane eindpunten opgeofferd dienen te worden. Deze humane eindpunten zouden bereikt kunnen worden als dieren een niet te behandelen infectie rondom het imaging window ontwikkelen, als dieren sneller dan verwacht grote tumoren (bijv. in de darm of lever) ontwikkelen en daardoor snel gewicht verliezen (>20% van hun gewicht), als dieren letharisch/moribund zijn of als dieren ernstige krab- of vechtwonden hebben. Omdat we het ontstaan van de tumoren nauwgezet zullen volgen met non-invasieve (IVIS) imaging voor we window chambers implanteren is de kans erg klein dat de dieren met tumoren op basis van humane eindpunten moeten worden opgeofferd. Verder,

door nauw samen te werken met het lab van ██████████, zullen we de kansen op lokale ontstekingen door de window chambers tot een minimum beperken. Zo verwachten we het aantal op te offeren muizen op basis van humane eindpunten <5% te houden.

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

We verwachten dat minder dan 5% van de dieren moet worden getermineerd vanwege dit criterium.

### **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 cumulatief ongerief schatten we in als licht-matig: 62% van de dieren ondervindt licht ongerief, dit betreft dieren in nieuw te genereren stammen. 38% van de dieren ondervindt matig ongerief ten gevolge van het implanteren van imaging windows, intravital imaging, eventuele tumorontwikkeling het het voortijdig opofferen van dieren op basis van humane eindpunten.

## **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.

Na de intravital imaging experimenten zullen dieren uitgebreid worden onderzocht op macroscopische pathologie en weefsels zullen worden opgestuurd voor histologie. Verder zullen aangedane organen worden opgeslagen voor verder onderzoek (eiwit, RNA, DNA, en single cell sequencing in enkele gevallen). De histologie van de weefsels zal worden vergeleken met de intravital imaging data.

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

**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** donderdag 12 mei 2016 10:26  
**Aan:** Info-zbo; [REDACTED]  
**CC:** Secretariaat DEC  
**Onderwerp:** RE: AVD105002016465\_aanhouden.beoordelen  
**Bijlagen:** Bijlage\_1 [REDACTED]\_r\_AVD105002016465.doc; Bijlage\_2 [REDACTED]\_AVD105002016465.doc;  
 Bijlage\_3 [REDACTED]\_AVD105002016465.doc; NTS\_Foijer\_AVD105002016465.docx;  
 Projectvoorstel [REDACTED]\_AVD105002016465.docx

Beste [REDACTED]

Dank voor Uw email aangaande onze CCD aanvraag AVD105002016465. Wij hebben alle vragen zo goed mogelijk proberen te beantwoorden: zie ook hieronder. Daarnaast hebben we de tekst van de aanvraag aangepast zoals toegelicht en verzocht. De aangepaste bestanden zijn bijgevoegd. We hopen dat de onduidelijkheden hiermee zijn verhelderd en horen het graag als U nog vragen heeft.

Zou U willen bevestigen of U de bestanden en antwoorden in goede orde heeft ontvangen?

**Vragen/onduidelijkheden:**

1) In bijlage 1 beschrijft u onder A dat "In geval van HSC transplantaties zijn 25 dieren per groep in onze ervaring voldoende". In de proef onder B waarin u donor en ontvangerdieren beschrijft, spreekt u echter over 50 dieren per groep. Kunt u dit verhelderen?

**Antwoord:** Dit is een vergissing van mijn zijde die door onze DEC en mijzelf over het hoofd is gezien. Excuses hiervoor. We willen inderdaad voor transplantatiestudies 25 dieren per groep bestuderen, 1 controle groep en 1 experiment groep (dus 50 dieren). De tumoren worden 1:1 getransplanteerd, we hebben dus ook een zelfde aantal recipient dieren nodig (50). In totaal vragen we voor dit experiment 100 dieren (en niet de eerder beschreven 200) aan. Het totaal aantal aan te vragen dieren daalt hierdoor met 100; dit is aangepast in bijlage 1 en de NTS.

2) In bijlage 2 beschrijft u dat u controlecohorten en het materiaal daaruit gebruikt voor verschillende dierproeftypes. In bijlage 2 beschrijft u echter voor elke proef alsnog een controlecohort. Dit lijkt dubbel. Kunt u dit verhelderen?

**Antwoord:** Dit was inderdaad niet duidelijk uitgelegd. Het dubbel gebruik van controlecohorten waarnaar verwezen wordt als zijnde 'vermindering' zijn de aneuploide en niet aneuploide niet-kanker weefsels uit dierproeftype 1, dit is nu beter uitgelegd onder 'vermindering, verfijning, vervanging'. De controles die nog wel worden opgevoerd onder dierproeftype 2 zijn niet aneuploide tumor controles. Dit is nu beter benoemd voor alle experimenten beschreven onder 'dieren' in dierproeftype 2 .

3) In de NTS heeft u de ongeriefsclassificatie uitgesplitst van licht tot ernstig. In de bijlagen dierproeven spreekt u over licht dan wel matig ongerief. Kunt u de ongeriefsclassificatie in de projectaanvraag beter uitsplitsen?

**Antwoord:** Dit was inderdaad verwarrend. Het ongerief is nu per te onderzoeken weefseltype gespecificeerd en gekwantificeerd (licht, matig, ernstig) voor alle drie de dierproeftypes.

4) Hiermee samenhangend willen wij u vragen beter te onderbouwen waardoor het ongerief bij de verschillende muismodellen wordt veroorzaakt.

**Antwoord:** Naast een uitsplitsing van de types ongerief voor de verschillende experimenten zijn ook de oorzaken van het ongerief nu per weefsel benoemd voor alle drie de dierproeftypes.

5) De humane eindpunten die u beschrijft zijn algemene humane eindpunten. Is het mogelijk deze voor de verschillende modellen specifiek te maken?

**Antwoord:** Aan de beschrijving van de humane eindpunten zijn nu ook model-specifieke parameters toegevoegd naast de algemene humane eindpunten.

6) In bijlage 3 beschrijft u dat u gebruik maakt van diermodellen uit bijlage 1 en 2, maar u voert ook het genereren van nieuwe muizenstammen op. Kunt u dit verhelderen?

**Antwoord:** Dit is nu beter toegelicht in dierproeftype 3: de nieuw te genereren lijnen betreft de muizen die de mitosemarkers conditioneel tot expressie brengen. Deze worden in samenwerking met de UMCG Mouse Clinic gemaakt. Om aneuploidie in deze lijnen te induceren, zullen deze lijnen gekruist worden met de muismodellen voor weefsel-specifieke aneuploidie (en aneuploïde kanker) zoals die beschreven zijn in dierproeftypes 1 en 2. De nieuwe stammen betreft dus de mitosemarker muizen en de combinatiestammen van mitosemarker met conditionele aneuploidie.

7) In bijlage 3, vraag D schrijft u: "Gedurende het gehele experiment zullen de muizen gesedeerd zijn,...". Wij nemen aan dat u bedoelt dat de dieren tijdens het imagen gesedeerd zijn. Kunt u dit bevestigen?

**Antwoord:** Dit is inderdaad een verwarrende formulering, een verkeerde definitie van experiment van mijn zijde. Ik heb dit aangepast in het dierproeftype 3: inderdaad, zoals U stelt zijn de dieren alleen enkele uren tijdens het imagen gesedeerd.

Hartelijke groeten,

■■■■

---

**Van:** Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]

**Verzonden:** maandag 9 mei 2016 17:02

**Aan:** ■■■■

**CC:** ■■■■

**Onderwerp:** AVD105002016465\_aanhouden.beoordelen

Beste ■■■■

Bijgevoegde brief wordt u niet meer per post gezonden.

In principe heeft u 14 dagen de tijd om deze vragen te beantwoorden. Als u echter uiterlijk donderdag 12 mei reageert, kan uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering behandeld worden.

Met vriendelijke groet,

■■■■

Centrale Commissie Dierproeven

---

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.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan  
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  
AVD105002016465

**Bijlagen**

1

**26 MEI 2016**

Datum

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 16 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "De rol van aneuploidie in kanker" met aanvraagnummer AVD105002016465. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 12 mei 2016, 20 mei 2016 en 23 mei 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. Deze informatie betrof consistentie tussen de NTS en het projectvoorstel op het vlak van ongerief-inschatting en doelcategorie. Daarnaast heeft u uitleg gegeven over de mogelijkheid te starten met dit project indien een parallel ingediende aanvraag niet of later vergund zou worden.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de algemene voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De voorwaarde betreffende afstemming van de go/no-go momenten met de IvD is om te voorkomen dat dieren onnodig in proeven worden ingezet.

De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1 sub a 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 "De rol van aneuploidie in kanker" starten. De vergunning wordt afgegeven van 25 mei 2016 tot en met 31 maart 2021.

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 15 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering, met toevoeging van twee algemene voorwaarden. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

### **Bezwaar**

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

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

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

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

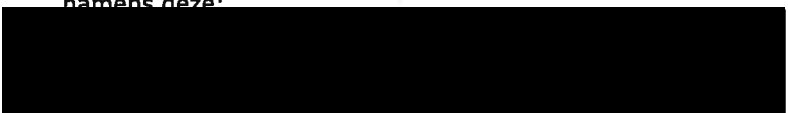
Voor de behandeling van een voorlopige voorziening is griffierecht verschuldigd. Op

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

### **Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
Ir. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

### **Bijlagen:**

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

Onze referentie  
Aanvraagnummer  
AVD105002016465

## Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Rijksuniversiteit Groningen

Adres: A. Deusinglaan

Postcode en plaats: 9713AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 24 mei 2016 tot en met 31 maart 2021, voor het project "De rol van aneuploidie in kanker" met aanvraagnummer AVD105002016465, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair docent. Voor de uitvoering van het project is Universitair docent verantwoordelijk. De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 16 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 23 mei 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 15 maart 2016, ontvangen op 16 maart 2016.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 12 mei 2016, 20 mei 2016 en 23 mei 2016.

| Naam proef   | Diersoort/ Stam         | Aantal dieren | Ernst                  | Opmerkingen                            |
|--|-------------------------|---------------|------------------------|--|
| Muismodellen voor aneuploidie in niet getransformeerde cellen              | Muizen (Mus musculus) / | 2636          | 100%<br>Licht          | 2236 volwassen dieren,<br>400 embryo's |
| Muismodellen voor aneuploidie in getransformeerde cellen                   | Muizen (Mus musculus) / | 4155          | 35% Licht<br>65% Matig |  |
| Muismodellen voor het visualiseren van aneuploidie en chromosoomsegregatie | Muizen (Mus musculus) / | 780           | 62% Licht<br>38% Matig |  |



Onze referentie  
Aanvraagnummer  
AVD105002016465

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

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

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende 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.

| Inventaris Wob-verzoek W16-16S |  |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
|--------------------------------|--|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
|                                |  |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
|                                |  |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
|                                |  | wordt verstrekt |      |        |       | weigeringsgronden |        |        |      |
| nr.                            | document                                 | reeds openbaar  | niet | geheel | deels | 10.1.c            | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
|                                | <b>NTS2016466</b>                        |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
| 1                              | Aanvraagformulier                        |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 2                              | Projectvoorstel                          |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 3                              | Niet-technische samenvatting oud         |                 |      | x      |       |                   |        |        |      |
| 4                              | Bijlage beschrijving dierproeven oud     |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 5                              | DEC-advies                               |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 6                              | Ontvangstbevestiging                     |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 7                              | Verzoek aanvulling aanvraag              |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 8                              | Mail reactie aanvulling 9-5-2016         |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 9                              | Projectvoorstel herzien                  |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 10                             | Niet-technische samenvatting herzien     | x               |      |        |       |                   |        |        |      |
| 11                             | Bijlage beschrijving dierproeven herzien |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 12                             | Advies CCD                               |                 | x    |        |       |                   |        |        | x    |
| 13                             | Beschikking en vergunning                |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |



17 MAART 2016

AVD 105002016466

### 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 10500  
 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: 01179037

---

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: A. Deusinglaan 1, [Redacted]

Postbus: [Redacted]

Postcode en plaats: 9713AV GRONINGEN

IBAN: [Redacted]

Tenaamstelling van het rekeningnummer: [Redacted]

---

1.4 Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.

(Titel) Naam en voorletters: [Redacted]  Dhr.  Mw.

Functie: Universitair docent

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: Universitair docent

Afdeling: [Redacted]

Telefoonnummer: [Redacted]

E-mailadres: [Redacted]

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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |               |
|------------|---------------|
| Startdatum | 1 - 4 - 2016  |
| Einddatum  | 31 - 3 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- Ontwikkeling van aneuploidie-targeting therapie
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- Zoeken naar aneuploidie specifieke kankertherapie
- 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 € 935 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.

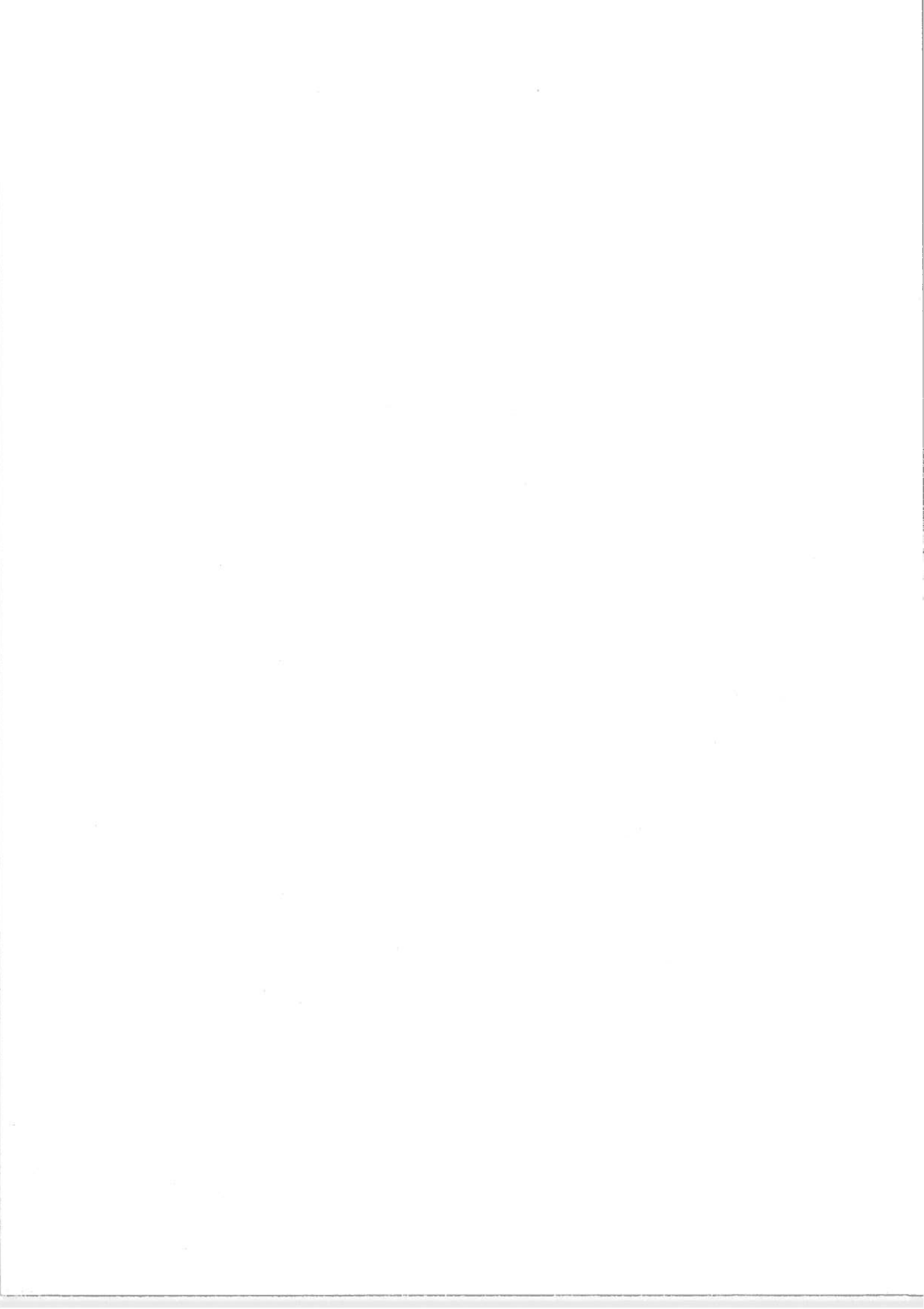
Naam 

Functie 

Plaats GRONINGEN

Datum 16-03-2016

Handtekening 







## Format Projectvoorstel dierproeven

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

Elke celdeling wordt ons erfelijk materiaal gerepliceerd en verdeeld over de twee nieuwe ontstane dochtercellen. Soms maken cellen een fout bij het verdelen van de chromosomen en ontstaan er twee cellen met een afwijkende hoeveelheid DNA. Dit proces noemen we chromosomale instabiliteit; de cellen met afwijkende hoeveelheden chromosomen noemen we aneuploïde. Kankercellen maken dit soort van fouten frequent en **twee van de drie tumoren zijn dan ook aneuploïde**. Omdat de omliggende gezonde cellen zelden tot niet aneuploïde zijn, vormt aneuploidie een veelbelovend aangrijppunt voor kankertherapie. Om tot zulke therapie te kunnen komen, moeten we eerst beter begrijpen waarom de meeste kankers aneuploïde zijn en dus wat de gevolgen zijn van aneuploidie voor het ontstaan van kanker.

Hiertoe zijn in de afgelopen 15 jaar diverse muismodellen gemaakt waarin systemisch (dus in alle weefsels van de muis) aneuploidie werd geprovoceerd. In deze modellen werden genen uitgeschakeld in het 'mitotic spindle checkpoint', een mechanisme dat in mitose bepaalt of alle chromosomen correct gebonden zijn aan de mitotische spoel. Het inactiveren van dit mechanisme leidt tot frequente fouten in de chromosoomverdeling en dus tot aneuploidie. Het systemisch inactiveren van genen in het mitotic spindle checkpoint leidt in alle gevallen tot vroege embryonale letaliteit (~E6.5). Heterozygote dieren lieten milde aneuploidie zien en in sommige gevallen een iets verhoogde frequentie van kankers (als de dieren een kankerpredispositie lieten zien, ontwikkelde ongeveer 1/3 van de dieren tumoren na 18-24 maanden) (zie voor review: ██████████). In veel gevallen waren deze dieren wel gevoeliger voor geïnduceerde kankers (bijvoorbeeld door het inactiveren van ██████████ of het blootstellen aan carcinogene stoffen). Samengevat hebben deze modellen ons geleerd dat chromosomale instabiliteit kanker versnelt maar dat het (in de muis) geen primaire oorzaak is van kanker. Verder lieten enkele van de modellen versnelde veroudering zien, wat suggereert dat aneuploidie ook gerelateerd is aan veroudering. Ondanks dat deze modellen wel de relatie tussen aneuploidie, kanker en veroudering hebben geschetst, zijn deze modellen minder geschikt om de moleculaire gevolgen van aneuploidie in kanker te onderzoeken, omdat de tumoren in deze modellen zeldzaam zijn, in diverse weefsels ontstaan en pas laat in het leven van de muis. Om in deze modellen de gevolgen van aneuploidie in kaart te brengen zouden onnodig veel dieren nodig zijn.

Wij hebben daarom conditionele knockout (cKO) muizen gemaakt, waarin we in weefsels naar keuze het mitotic spindle checkpoint kunnen uitschakelen (██████████ cKO) of verzwakken (██████████ cKO). Middels deze modellen onderzoeken we wat te moleculaire gevolgen zijn van aneuploidie voor weefselontwikkeling, en verder hoe aneuploidie leidt tot kanker. In deze modellen kunnen we ernstige aneuploidie veroorzaken op weefselniveau en op deze wijze hebben we een tumormodel (T-cell acute lymphoblastic lymphoma) kunnen ontwikkelen, waarin 100% van de muizen binnen 3 maanden (██████████) (██████████) of 4 maanden (██████████) (██████████) aneuploïde lymphomen ontwikkelen. Dankzij deze modellen hebben we een zeer reproduceerbaar en gedefinieerd tumorcohort kunnen genereren, en kunnen we beter de moleculaire gevolgen van aneuploidie in kaart brengen.

Zoals de eerdere modellen al suggereerden, laten ook onze modellen zien dat chromosomale instabiliteit alleen niet voldoende is voor kanker. We hebben dit

laten zien in T-cellen ( ), de lever ( ) en de huid ( ) wat aangeeft dat aneuploïde cellen nog extra mutaties nodig hebben om te transformeren in aneuploïde kankercellen. Daarnaast hebben we gevonden dat verschillende celtypes op verschillende wijze omgaan met aneuploïdie. Zo blijken T-cellen ( ), levercellen ( ) en basal epidermal cells ( ) vrij goed tegen aneuploïdie te kunnen, in tegenstelling tot bijvoorbeeld de bulge stamcellen van de huid, die in de haarfollikel liggen ( ). Dit laatste type cellen gaat net als cellen in weefselweek relatief snel dood (Kops et al, PNAS, 2004 Jun 8; 101(23):8699-704) t.g.v. aneuploïdie. Dit geeft aan dat de verschillende celtypen op verschillende wijze omgaan met aneuploïdie en benadrukt het belang van weefselspecifieke knockouts om the komen tot therapieën die selectief aneuploïde kankers aanpakken.

### 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?

Twee van de drie kankers is aneuploïde en de afgelopen 15 jaar zijn er dan ook diverse muismodellen gegenereerd om te onderzoeken hoe aneuploïdie kan leiden tot kanker. Tot nu toe waren dit alleen conventionele knockout muismodellen (knockout in alle lichaamscellen; zie voor review bijv.: (Schvartzman J-M, *et al* Nat Rev Cancer; 2010; 10:102–15) waarbij grootschalige aneuploïdie zonder uitzondering leidde tot vroege embryonale letaliteit (<E8.5). Heterozygote inactivatie van de bestudeerde genen leidde tot zwakke tumorfenotypes, waarbij ~30% van de dieren aan het einde van hun leven (18-24 maanden) tumoren kregen in diverse weefsels. Daarom lenen deze modellen zich er niet voor om gestructureerd de fysiologische gevolgen van aneuploïdie in kanker te onderzoeken.

Paradoxaal genoeg leidt aneuploïdie in weefselweek tot een groeinadeel, niet een groeivoordeel (Kops GJPL *et al*, Proc Natl Acad Sci USA. 2014;101:8699–704); (Williams BR, *et al* Science; 2008; 322:703–709). Dit suggereert dat aneuploïde kankercellen zich aan hebben weten te passen aan de nadelen van aneuploïdie. Dit betekent ook, dat als we beter begrijpen hoe aneuploïde kankercellen omgaan met de (nadelige) gevolgen van aneuploïdie, we mogelijk kunnen komen tot manieren om aneuploïde kankercellen selectief te doden, het lange-termijn doel in mijn lab. Daarvoor moeten we in eerste instantie beter begrijpen hoe kankercellen en niet-kwaadaardige cellen omgaan met aneuploïdie. Hiervoor hebben we conditionele knockout allelen gegenereerd (voor en ) waarmee we aneuploïdie kunnen provoceren op weefselspecifiek niveau. Deze modellen stellen ons, in tegenstelling tot de vroegere modellen, in staat om gestructureerd te onderzoeken hoe weefsels en tumoren omgaan met aneuploïdie en hoe dit leidt tot kanker ( ). In een in parallel ingediend projectvoorstel onderzoeken hoe cellen aneuploïde worden, hoe aneuploïdie cellen helpt om kwaadaardig te worden en wat de fysiologische gevolgen zijn van aneuploïdie. Om uiteindelijk te komen tot nieuwe therapie die aneuploïdie gebruikt om kankercellen te doden stellen we in dit project de **volgende vraag**:

1. Hoe kan aneuploïde kanker specifiek bestreden worden? Twee van de drie kankers zijn aneuploïde. Het selectief doden van aneuploïde cellen is dus, in theorie, een hele effectieve manier om kanker te bestrijden. Helaas zijn hiervoor nog geen geneesmiddelen beschikbaar. Dat het selectief doden van aneuploïde cellen in principe mogelijk is, heeft ons eigen werk en dat van onze collega's al eerder laten zien in een proof of principle experiment. Aneuploïdie leidt namelijk tot een ontregeling van het metabolisme en de eiwithuishouding. Deze ontregeling kan worden verergerd door weefselweekcellen te behandelen met de ( ). Aneuploïde cellen blijken in weefselweekexperimenten namelijk gevoeliger voor ( ) behandeling dan niet aneuploïde cellen (Tang *et al*, Cell. 2011; 144(4): 499-512). Wij hebben deze bevindingen in kweek bevestigd en willen

dit nu valideren in onze muismodellen voor aneuploïde kanker. Zo willen we de effectiviteit van [REDACTED] vergelijken met de effectiviteit van bestaande therapieën zoals [REDACTED]. Daarnaast zullen de experimenten beschreven in het in parallel ingediende projectvoorstel leiden tot verder begrip van hoe kankercellen zich aanpassen aan de nadelen van aneuploïdie. Als we beter weten hoe cellen in de diverse weefsels zich aanpassen aan aneuploïdie, dan kunnen we hierop ingrijpen met small molecule compounds (vergelijkbaar als [REDACTED] en daarmee de aneuploïde cellen mogelijk specifiek doden. Dergelijke kandidaat compounds zullen eerst uitgebreid in celweek getest worden, maar willen we uiteindelijk ook testen in onze muismodellen voor aneuploïde kanker om het te bewijzen mechanisme *in vivo* te valideren. Belangrijk om te vermelden is ook dat het testen van deze compounds geen systematische screening van compounds vanuit de farma betreft, maar gericht gekozen compounds die selectief pathways targetten zoals [REDACTED] of compounds te ontdekken vanuit ons andere projectvoorstel en dienen om het moleculair mechanisme beter te begrijpen.

**Haalbaarheid:** De hierboven benoemde vraag kunnen we beantwoorden met de dierexperimenten beschreven in dit voorstel. Voor de gestelde vraag zijn de modellen al beschikbaar, of kunnen we de modellen genereren samen met onze collega's binnen [REDACTED]. In dit voorstel zullen we interfereren met processen die van aneuploïdie cellen een kanker cel maken om aneuploïde kanker te bestrijden. Dit zal in eerste instantie gebeuren middels bekende kankertherapeutica, dosering en protocol zijn dus bekend, maar deze therapeutica zijn nog nooit specifiek op dit soort van diermodellen getest. Dit levert dus kennis op over de efficiëntie van deze therapeutica in de behandeling van aneuploïdie tumoren. Daarnaast biedt het de mogelijkheid om onze modellen te valideren voor dit soort van preklinische tests. Het door ons in parallel ingediend projectvoorstel zal leiden tot nieuwe therapeutica die aneuploïde cellen kunnen doden. Alvorens we dit soort van kandidaat compounds in de muis zullen testen, zullen we, zoals aangegeven, deze eerst uitgebreid *in vitro* testen (zoals we reeds doen voor [REDACTED] als beschreven in Tang et al).

### 3.3 Belang

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

Het primaire belang van dit onderzoek is wetenschappelijk. 2 van de 3 kankers zijn aneuploïde. Ondanks dit gegeven, zijn er nog geen therapieën beschikbaar die selectief aneuploïde cellen kunnen bestrijden, terwijl aneuploïde zo'n belangrijk onderscheidende factor van 'gezonde' lichaamscellen is. Om tot dergelijke therapie te komen, moeten we eerst beter begrijpen hoe cellen en weefsels omgaan met aneuploïdie, kennis die we vergaren vanuit een parallel ingediend projectvoorstel. Dit doen we waar mogelijk met celweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celweek vaak anders op aneuploïdie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploïdie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploïdie in diermodellen de onderzoeken. Onze modellen zijn wereldwijd uniek en hebben al belangrijke resultaten opgeleverd over aneuploïdie en de gevolgen daarvan. In deze experimenten werken we deze bevindingen verder uit en komen we stap voor stap steeds dichterbij mogelijke therapieën die selectief aneuploïde cellen kunnen doden, welke zeer belangrijk kunnen worden in de behandeling van 2 van de 3 kankers, maar mogelijk ook kunnen helpen veroudering beter te begrijpen om uiteindelijk de gevolgen van het ouder worden te kunnen vertragen (healthy ageing), twee zeer belangrijke maatschappelijke belangen. Dit doen we waar mogelijk met celweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celweek vaak anders op aneuploïdie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploïdie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploïdie in diermodellen de onderzoeken.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het doel van deze aanvraag is komen tot manieren om aneuploïde (kanker)cellen selectief te doden. Hiertoe nemen we de volgende benaderingen:

- 1) We zullen onze bestaande muismodellen voor aneuploïde kanker behandelen met bestaande therapeutica (bijv. ██████████) om te kijken of er verschillen zijn in de uitkomst bij middelen die DNA schade provoceren (zoals ██████████) en middelen die chromosomale instabiliteit veroorzaken/verergeren (██████████). Aangezien deze middelen in de kliniek toegepast worden is dosering en toxiciteit bekend.
- 2) We zullen onze bestaande muismodellen voor aneuploïde kanker gebruiken om de nieuw gevonden aneuploïdy targeting compounds ██████████ - ██████████ te testen in hun effectiviteit om aneuploïde kanker te genezen.
- 3) We zullen de kennis gegenereerd vanuit het in parallel ingediend projectvoorstel benutten om te komen tot nieuwe therapeutica die aneuploïde cellen selectief doden, welke we zullen testen in onze muismodellen voor aneuploïde kanker, zoals beschreven onder benaderingen 1 en 2.

Samenvattend zullen we, gebruikmakend van de kennis gegenereerd in het in parallel ingediend projectvoorstel, onze muismodellen eerst valideren voor het preklinisch testen van kankertherapeutica, om daarna deze muismodellen te gebruiken voor het feitelijk preklinisch testen van te valideren en nieuw te ontdekken aneuploïdie-targeting therapeutica.

---

#### 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 dit project stellen we 1 hoofdvraag:

1. Hoe kan aneuploïde kanker specifiek bestreden worden?

Deze vraag zullen we beantwoorden middels 1 dierproeftype:

- Interventiemodellen voor aneuploïde kanker.

---

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

---

Voor vraag 3 zullen we de kennis uit het in parallel ingediend projectvoorstel omzetten in therapie. In de eerste twee jaar zullen we beginnen met het testen van ██████████ behandeling van aneuploïde kankers (om de aneuploïdie zelf te verergeren) om te testen of dit in geval van aneuploïde kankers juist een goed (cellen gaan dood) of slecht (aneuploïde cellen kunnen goed tegen aneuploïdie) idee is. Voor deze compounds zijn farmacokinetiek en – dynamiek in de muis bekend). In parallel zullen we testen of het ontregelen van het tumormetabolisme ██████████; wordt gebruikt bij herstel na hartoperaties in de mens, dosering dus afleidbaar) een goede behandeling is voor aneuploïde tumoren. Daarnaast zullen met name vraag 2 biologische processen blootleggen die aneuploïde cellen nodig hebben om maligne te worden. Deze processen zullen we chemisch gaan remmen of juist harder aanzetten om zo de aneuploïde kankercellen te doden. Deze experimenten zullen we pas starten als 1) we de werking van de compounds uitgebreid in weefselkweek gevalideerd hebben, 2) er gevalideerde kandidaatgenen hebben uit de voorgaande vragen en 3) als de compounds veilig in de muis gebruikt kunnen worden (literatuurstudie of toxiciteitstesten). Voor dit soort nieuwe compounds zullen we dan ook pas vanaf ongeveer jaar 3 kunnen beginnen.

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

| Volgnummer | Type dierproef                             |
|------------|--|
| 1          | Interventiemodellen voor aneuploïde kanker |
| 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 | Zoeken naar aneuploidie specifieke kankertherapie
- 1.2 Looptijd van het project | 5 jaar
- 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Aneuploidie, kanker, kankertherapie

## 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) | Aneuploidie is een afwijkende hoeveelheid erfelijk materiaal in de celkern. Aneuploidie is een veelvoorkomende eigenschap van kankercellen; twee van de drie kankers bestaan uit cellen die aneuploide zijn. Daarmee is een eigenschap waarmee men kankercellen kan onderscheiden van gezonde lichaamscellen. Het specifiek doden van aneuploide kankercellen zou mogelijk een zeer selectieve manier kunnen zijn om een groot deel van de kankers aan te pakken. Tot dusver is er geen therapie beschikbaar die selectief aneuploide cellen kan doden. In dit onderzoek zullen we nieuwe en bestaande therapeutica testen voor hun effectiviteit in het (selectief) doden van aneuploide kankercellen. Hiervoor zullen we gebruik maken van muismodellen ontwikkeld in ons lab, waarin zeer reproduceerbaar aneuploide acute T-cel lymphomen ontstaan. Door dit onderzoek zullen we beter inzicht krijgen wat de beste manier is om aneuploide kankers te behandelen, wat mogelijk leidt tot selectievere anti-kankertherapie met minder bijwerkingen. |
| 3.2 Welke opbrengsten worden van dit project verwacht en hoe dragen deze bij aan het wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang?         | Door dit onderzoek zullen we komen tot:<br>1) een mogelijke verbetering voor de behandeling van aneuploidie tumoren middels bestaande therapeutica (wetenschappelijk en maatschappelijk doel)<br>2) de eerste stappen richting aneuploidie-selectieve therapie (wetenschappelijk en maatschappelijk doel).<br><br>Verder zal dit project leiden tot:<br>1) muismodellen waarin we voor het eerst een mogelijke aneuploidiespecifieke therapie kunnen testen (wetenschappelijk en maatschappelijk doel).<br>2) Alternatieven voor dierproeven (weefselkweek, organoids).   |
| 3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?  | Voor ons onderzoek zullen we gebruik maken van volwassen transgene en wildtype muizen (maximaal 700)  |
| 3.4 Wat zijn bij dit project de verwachte negatieve gevolgen voor het welzijn van de proefdieren?   | De meerderheid van de van de dieren zal beginnende tumoren ontwikkelen. Deze zullen worden behandeld met diverse therapie, waarop de tumoren wel of niet verdwijnen. Tumoren zullen middels non-invasieve imaging gevolgd worden zodat dieren tijdig getermineerd kunnen worden indien de therapie niet werkt.  |
| 3.5 Hoe worden de dierproeven in het project ingedeeld naar de verwachte ernst?   | ~25% van de dieren zal mild ongerief (injecties, non-invasieve imaging, wegen) hebben; ~72% van de dieren zal matig ongerief hebben (tumoren, tumortransplantaties), ~3% zal ernstig ongerief hebben (vorderende of uitgezaaide tumor, opofferen op basis van humane eindpunten).   |
| 3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?   | De dieren zullen aan het einde van het experiment gedood worden voor uitgebreide analyse.   |



## 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.

Proefdieren zijn nodig omdat de te onderzoeken processen in een levend organisme moeten plaatsvinden. Al onze experimenten worden vooraf gegaan door uitgebreid weefselkweekonderzoek, waarin we onderzoeken hoe in kweekschaaltjes cellen omgaan met aneuploidie en hoe aneuploide cellen reageren op onze nieuw ontdekte therapieën. Pas als we heel zeker zijn van onze weefselkweekbevindingen, zullen we overgaan tot het testen in muizen, omdat dit het meest geschikte model is om kanker te onderzoeken. Ons voorgaand werk heeft namelijk duidelijk laten zien dat hoe cellen in weefselkweek reageren op aneuploidie niet altijd overeenkomt met hoe cellen in een weefsel reageren. Daarnaast is het tot dusver onmogelijk gebleken om kanker en andere complexe biologische processen betrouwbaar alleen in weefselkweek te modelleren. Uiteindelijk zijn deze proefdiermodellen noodzakelijk voor het vervolgstadium waarbij de nieuwe therapie in klinische studies in de mens verder wordt gevalideerd.

### 4.2 Vermindering

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

Voor elk dierexperiment zullen we voorafgaand een statistische analyse uitvoeren om het precies aantal benodigde dieren te berekenen. In gevallen waarbij we niet perfect het aantal benodigde dieren van tevoren weten (bijvoorbeeld als we een nog onbekend biologisch proces bestuderen), zullen we altijd eerst een kleine groep dieren testen (pilot cohort, gebaseerd op jarenlange ervaring) om te komen tot de correcte complete groepsgrootte. Tenslotte houden we ons via literatuur en ons professionele netwerk op de hoogte van het werk van onze collega's om duplicatie van dierexperimenten te voorkomen. Op deze wijze dragen we er zorg voor dat we een minimum aantal proefdieren nodig zullen hebben en dat ongerief tot een minimum beperkt blijft.

### 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 muis is het meest geschikte model voor dit type onderzoek gezien de kennis, hulpmiddelen en technieken die beschikbaar zijn voor kankeronderzoek in de muis. We onderzoeken de effecten van aneuploidie met name in weefsels waar muizen er relatief weinig last van ondervinden en beëindigen experimenten voordat muizen ernstig ongerief ondervinden.

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

Tumoren zullen in eerste instantie optreden in het weefsel waarin we de aneuploidie geïnduceerd hebben. Deze weefsels zullen uitgebreid gemonitord worden. Door onze ruime ervaring en de ruime ervaring van onze dierverzorgers zullen dieren opgeofferd worden bij de eerste symptomen van ongerief. Op deze wijze zullen we het ongerief tot een minimum beperken. Dieren zullen daarom zeer regelmatig geïnspecteerd worden om ongerief zo vroeg mogelijk te zien. Dieren zullen worden verdoofd waar nodig (bijvoorbeeld bij intravital imaging). Door op weefselniveau te kijken naar aneuploidie wordt eventueel ongerief beperkt tot 1 orgaansysteem. Bovendien ligt het focus op orgaansystemen waarin tumoren relatief weinig

[

mogelijk te houden.

ongerief/pijn geven (bloed, lever, huid, cerebellum) en zal onze kennis van de modellen eraan bijdragen dat de dieren worden opgeofferd voordat ze ongerief zullen ondervinden van de tumoren.

## 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.           | 10500  |            |                |   |  |
|------------|--|--|------------|----------------|---|--|
| 1.2        | Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Rijksuniversiteit Groningen  |            |                |   |  |
| 1.3        | Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | <table><thead><tr><th>Volgnummer</th><th>Type dierproef</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Interventiemodellen voor aneuploide kanker</td></tr></tbody></table> | Volgnummer | Type dierproef | 1 | Interventiemodellen voor aneuploide kanker |
| Volgnummer | Type dierproef                                   |  |            |                |   |  |
| 1          | Interventiemodellen voor aneuploide kanker       |  |            |                |   |  |

*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.

In dit type dierproef zullen we onze opgedane kennis over welke processen van aneuploide cellen aneuploide kankercellen maken valideren door dieren met aneuploide tumoren te behandelen met therapeutica die selectief aneuploide cellen doodmaakt. Deze experimenten dienen om 1) te valideren of onze muismodellen voor aneuploide kanker geschikt zijn als preklinische modellen, 2) om te kijken welke bestaande chemotherapeutica het meest geschikt zijn om aneuploide kanker te behandelen, en 3) om nieuwe middelen die selectief aneuploide kankercellen doden in celweek in vivo te valideren. Hiervoor maken we gebruik van onze krachtige T-ALL tumormodellen: aneuploide [REDACTED]; T-ALL, [REDACTED] aneuploide T-ALL en controle (niet aneuploide) [REDACTED]; T-ALL. In alle drie deze genotypes ontstaan tumoren in de thymus 3-5 maanden na geboorte, waarbij de eerste 2 genotypes aneuploide tumoren geven. We zullen in

deze dieren middels een genetische fluorescente reporter (Rosa-STOP-LOX-STOP-Tomato) alle knockout T-cellen rood labelen. Op deze wijze kunnen we middels de IVIS bodyscanner zien of de dieren al tumoren hebben ontwikkeld. Dieren met een beginnende tumor zullen dan behandeld gaan worden met de verschillende therapeutische regimes die ons onderzoek voorspelt te werken voor aneuploide kankers.

De primaire uitleesparameters voor dit dierproeftype zijn:

- tumorgrootte (te bepalen middels bloedmetingen en door de IVIS scanner (de tumoren zijn fluoriscent gelabeld met een reporter gen). We zullen de tumorontwikkeling volgen in de tijd en in relatie tot de diverse te testen therapeutica. In een enkel geval zullen we dieren ook met MRI meten.
- tumor differentiatie/type: dit zullen we meten met flowcytometrie
- aneuploidie: we zullen de tumoren regelmatig valideren op aneuploidie middels metaphase spreads, interphase FISH en single cell sequencing. We zullen ook kijken of de aneuploidie verandert in tumoren die therapieresistent worden.
- tumor transcriptoom: we zullen kijken hoe de tumoren reageren op therapie en hoe de transcriptomen veranderen als de tumor resistent terugkomt.
- tumorgenoom: in geval van resistente tumoren zullen we mogelijk gaan kijken welke mutaties hieraan hebben bijgedragen met whole genome sequencing.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

De dieren zullen worden behandeld met drie 'types' therapeutica. Het eerste type betreft gevalideerde therapeutica die reeds gebruikt worden in de kliniek tegen kanker (bijvoorbeeld ██████████). In dit type experiment willen we kijken welk type bestaande therapie het beste werkt op aneuploide tumoren, met name omdat bepaalde therapie juist werkt door cellen ██████████) en de vraag is of dit een goed idee is bij aneuploide tumoren die al goed om kunnen gaan met aneuploidie of dat deze tumoren beter behandeld kunnen worden met DNA-schade inducerende compounds zoals ██████████.

Type twee zijn therapeutica die wel gebruikt worden in de kliniek, maar nog niet in de bestrijding van kanker (bijv. ██████████). De dosering is hiervan bekend, maar het effect op (aneuploide) kanker nog niet. Een ander voorbeeld is ██████████ waar wij van denken dat het heel effectief zal zijn in de bestrijding van aneuploide T-cel lymphomen.

Het derde type therapeutica betreft nieuw te vinden middelen uit ons onderzoek in mijn lab. Deze therapeutica zullen we alleen gaan gebruiken als we de werkbare doet in de muis kennen (nieuwe compounds, door anderen in muizen of klinische trials getest). Zo willen we graag binnenkort een Prmt5 inhibitor gaan testen in onze modellen, omdat ██████████ belangrijk lijkt te zijn voor de activatie van de mTOR pathway en sterk opgereguleerd in in al onze aneuploide T-cel lymphomen.

Behandeling/ experiment opzet:

Voor elk experiment (type 1, 2 of 3) zullen we de benodigde experimentdieren (aneuploid T-cel lymphoom) en controle dieren (niet-aneuploide T-cel lymphoom) tumoren laten ontwikkelen. Deze tumoren zullen gelabeld zijn met een fluoriscent reporter gen (Rosa26-stop-lox-stop-Tomato), zodat we de tumoren zodra ze ontstaan kunnen meten in de IVIS bodyscanner. Zodra we de tumoren kunnen meten (primaire tumor), zullen de muizen behandeld worden met muis-geoptimaliseerde doses\* (1 week behandeling, om de dag IP of IV injectie) van de te testen compounds. Tumorgrootte (en dus therapierespons) zal dan bepaald worden met de IVIS bodyscanner (meting ongeveer 1 x per week) en in enkele gevallen middels muis-MRI. Voor dit laatste zijn we momenteel aan het valideren of dit bovenop de IVIS scans toegevoegde waarde heeft. Indien de tumoren niet verdwijnen binnen 1-2 weken, zullen dieren

direct worden opgeofferd (non-respons). Tumoren zullen uitgebreid worden geanalyseerd middels de hierboven beschreven uitleesparameters. Indien de tumoren wel verdwijnen, zullen dieren gevolgd worden voor het ontstaan van recidief tumoren wederom door 1 x per week fluorescentie te meten in de IVIS bodyscanner. Indien geen recidief ontreedt, zullen de muizen maximaal 3 maanden gevolgd worden met IVIS imaging en dan worden opgeofferd (behandeling is curatief). Muizen met recidief worden of direct opgeofferd (gevolgd door uitgebreide analyse: recidieftumoren) of eventueel opnieuw behandeld worden om eventueel opgetreden therapie-resistentie te meten (zie ook onder B 'aantallen dieren'). Als de tumoren niet verdwijnen door recidief therapie (~2 weken behandeling) zullen dieren opgeofferd worden (therapieresistent recidief). Dieren waarbij het recidief wel verdwijnt, zullen ook gevolgd worden met IVIS imaging (1x per week) tot er weer een tumor ontstaat (waarop uitgebreide analyse gedaan zal worden; tweede recidief) of voor maximaal 3 maanden na de laatste behandeling (behandeling curatief).

\* Voor de behandeling van de dieren zullen we dosering gebruiken zoals gebruikt in relevante literatuur: In geval van [redacted] is dit 0.5 mg/kg (Li et al, J Clin Invest. 2015 Mar 2;125(3):1081-97), in geval van [redacted] is dit tot 30 mg/kg ([redacted]), voor [redacted] 25mg/kg (Sharp et al, Am J Physiol Renal Physiol. 2016 Jan 6;ajprenal.00512.2015), voor [redacted] (Zhou et al, Innate Immun. 2015 Oct;21(7):698-705) en voor [redacted] (Shi et al, J Hematol Oncol. 2016 Feb 18;9(1):12), (Siman et al, PLoS One. 2015 Nov 5;10(11):e0142340), en (Cullion et al, Blood. 2009 Jun 11;113(24):6172-81).

---

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

Per therapie willen we de respons in totaal 20 experiment dieren vergelijken met die in 20 controle dieren. Dit getal volgt een power-analyse. In dit geval is de variatiecoëfficiënt sigma vooraf niet bekend; de proefgrootte wordt daarom afgelezen van een uit Owen afgeleide grafiek (Proefdieren en Dierproeven, L.F.M van Zutphen, vijfde druk, 2009, blz 211). Voor dit experiment stellen we een onbetrouwbaarheidsdrempel (alpha) van 0.05 of een power (pi) van > 0.8 en een verhouding tussen het te meten verschil ( $\mu_1 - \mu_2$ ) en variatiecoëfficiënt op ongeveer 1.5. Dit laatste betekent dat er bij een spreiding van ongeveer 2 maanden in de overleving binnen 1 groep een significant verschil gemeten wordt als de gemiddelde overleving tussen experiment en controlegroep minimaal 3 maanden uit elkaar ligt; een spreiding van ongeveer 2 maanden binnen een cohort is gemiddeld binnen onze bestaande T-ALL muismodellen. Er valt dan uit de grafiek af te lezen dat de proefgrootte ongeveer 20 dieren dient te zijn.

Echter, omdat we van te voren niet zeker weten of een therapie enig effect geeft, zullen we voor iedere therapie eerst een pilot uitvoeren op 5 aneuploide en 5 niet aneuploide dieren om globaal de tumorrespons te meten. Dieren zullen worden opgeofferd zodra de tumoren terugkomen of niet verdwijnen. Op deze wijze leren we ook al iets over de latentie van een mogelijk recidief. Als de therapie lijkt te werken, zullen we een groter cohort testen (go/no-go keuzemoment). We zullen dan 15 extra aneuploide en 15 extra niet aneuploide dieren behandelen met de therapie. Van deze uitgebreidere groepen zullen we 10 aneuploide/niet aneuploide dieren opnieuw behandelen om therapieresistentie te bepalen, de overige 5 zullen direct worden opgeofferd als de tumor is teruggekomen. Op deze wijze kunnen we voor 10 muizen per therapie materiaal verzamelen van een primair recidief en in 10 muizen kijken of dit recidief resistent geworden is voor therapie. Tumoren zullen worden onder meer geanalyseerd op (extra) mutaties, transcriptoomveranderingen en aneuploidie zoals beschreven onder de primaire uitkomstparameters.

---

## B. De dieren

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

Alle experimenten zullen worden uitgevoerd op transgene muizen. We maken gebruik van mannen en vrouwen, omdat we geen verschil verwachten tussen de sexes. Voor dit type dierproef zullen alleen volwassen muizen uit eigen fok (heel soms bestellen we dieren vanuit extern, zoals van Jackson Labs) gebruikt worden, in sommige gevallen zullen dieren als jong volwassene al behandeld worden op Cre te activeren. Binnen dit type dierproef zullen we de volgende

cohorten volgen:

Per te testen therapie zullen we 40 dieren gebruiken; 10 voor de pilot (5 per genotype) en 30 (15 per genotype), voor het uiteindelijke experiment (zie voor motivatie pilot en uiteindelijk experiment onder statistische methoden).

We willen de volgende behandelingen testen:

- ██████████ (om te testen of verergeren van chromosomale instabiliteit aneuploide tumoren doodt en of dit eerder leidt tot resistente tumoren met als controle ██████████ behandelde dieren. (3 x 40 = 120 dieren; type 1).
- ██████ om te testen of aneuploide tumoren slechter tegen ██████████ kunnen dan niet aneuploide tumoren (40 dieren, type 2).
- ██████████ om te testen of aneuploid T-cell lymfoom gevoeliger is dan niet aneuploid T-cell lymfoom voor ██████████ (40 dieren, type 2).
- Nader te bepalen compounds, te identificeren uit werk komende jaren, schatting 5 compounds: 200 dieren (type 3).

Subtotaal: 400 dieren

Voor dit type dierproef hoeven geen nieuwe stammen te worden gegenereerd. Wel moeten we de ██████████, de ██████ en de ██████████ T-ALL lijnen aanhouden, dit is fok met ongerief omdat een op de vier van de muizen T-cell lymfoom ontwikkelt.

Per jaar worden beide stammen 4 x gefokt en krijgen we ongeveer 20 nakomelingen per stam. Per jaar leidt dit dus tot 20 dieren met ongerief (4 x fokken, 20 nakomelingen per fok, 1 op de vier aangedaan), dus 100 dieren in totaal per stam voor de 5 jaar van deze aanvraag. Aangezien we 3 stammen met ongerief aanhouden vragen we hiervoor 300 dieren aan voor de loop van de aanvraag.

Subtotaal 300 dieren.

Totaal vragen we aan voor dit type dierproef: 700 dieren.

---

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

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

Nee

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

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

Waar mogelijk doen we onze experimenten met celkweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celkweek vaak anders op aneuploidie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploidie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploidie in diermodellen te onderzoeken.

Alle compounds en behandelingen zullen eerst uitgebreid getest en gevalideerd worden in weefselkweek voordat ze in diermodellen getest zullen worden (vervanging en vermindering). We kiezen voor het testen van therapeutica bewust het T-ALL model, omdat het snel en reproduceerbaar is, waardoor we de latentie goed kunnen voorspellen (verfijning). Daarnaast labelen we de tumoren met een marker, zodat we de tumoren in een vroeg stadium kunnen zien, wat ongerief vermindert. Dit alles dient ter verfijning van de strategie. Verder gebruiken we binnen elk cohort dieren om te kijken of de tumor bestreden kan worden, of de tumor terugkomt en of de teruggekomen tumor resistent is geworden. Hiermee beantwoorden we drie vragen per therapie middels 1 cohort (vermindering).

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

Dieren zullen behandeld worden voordat ze ongerief ondervinden van de tumoren. Aangezien we dit model goed kennen en we de tumoren met IVS en mogelijk ook enkele dieren met MRI zullen visualiseren, zullen de dieren minimaal ongerief ondervinden. Omdat we de dosering van de therapeutica baseren op literatuurwaarden kunnen we eventuele bijwerkingen van de therapeutica tot een minimum beperken. Deze bijwerkingen leiden meest waarschijnlijk in eerste instantie tot gewichtsverlies, iets wat we nauwgezet zullen volgen door de dieren regelmatig te inspecteren (minimaal 2 keer per week door onderzoeker en dagelijks door diervoorzorging).

### **Herhaling en duplicering**

#### **E. Herhaling**

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

Deze proeven zijn nog niet eerder uitgevoerd. Hiervoor hebben we een uitgebreide zoekopdracht op PubMed uitgevoerd en daarnaast gesproken met onze diverse collega's die dit soort modellen ontwikkelen ( [REDACTED] )

### **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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

We zullen de dieren behandelen voor ze ernstig ziek worden van de (aneuploide) bloedkankers. We kennen de latentie van deze modellen goed en kunnen zo ongerief minimaliseren. Onze ervaring met dit model heeft ons geleerd dat de dieren geen ongerief hebben van de beginnende tumoren. In tweede instantie kunnen na behandeling opnieuw tumoren ontstaan die resistent zijn. Dit kan dit beginnend ongerief leiden wat zich op dezelfde wijze zal uiten als de bij ons bekende primare tumoren (kortademigheid, gewichtsverlies). Verder kunnen eventuele bijwerkingen van de therapie leiden tot gewichtverlies (tijdelijk verlies functionaliteit darmepitheel).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het meeste ongerief komt door de lymfomen die zullen ontstaan. Verder is er mild ongerief door de non-invasieve IVIS of MRI imaging. Tenslotte kunnen dieren ongerief ontwikkelen door de toe te passen therapeutica (verlies microvilli in darm door afdoden delende cellen (bijv. na [REDACTED])).

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



Dieren zullen zeer regelmatig (minimaal 2 maal per week) uitgebreid geïnspecteerd worden door de onderzoekers en als dat we de tumoren verwachten 1 x per week met de IVIS worden bekeken. Enkele dieren zullen met MRI gescand worden afhankelijk van een momenteel lopende pilot in het lab. Daarnaast worden de dieren dagelijks door de diervoorzorging gecontroleerd. Dieren zullen worden behandeld met de te testen therapie of worden opgeofferd zodra ze het eerste meetbare ongerief van de kankers krijgen (toename fluorescent signaal op IVIS, gewichtsverlies, bleekheid ('witte oren'), kortademigheid). Bij dieren die therapie krijgen zal extra worden opgelet of ze nadelige effecten van de middelen ondervinden zoals gewichtsverlies. Om dit laatste type ongerief zoveel mogelijk te voorkomen zullen de dosering van de middelen aanpassen op de waarden genoemd in de literatuur, waar mogelijk en dieren extra te monitoren tijdens de behandeling. Tenslotte zullen dieren worden opgeofferd als de therapie niet aanslaat (bij geen respons binnen 2 weken na start therapie).

#### **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 de minderheid van de gevallen zullen dieren dusdanig ernstig ziek worden dat de op basis van humane eindpunten opgeofferd dienen te worden. Dit zal zijn als de dieren moribund zijn, lethargisch zijn, >20% van hun gewicht verloren zijn of ernstige (vecht)wonden hebben.

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

We streven ernaar dat zo min mogelijk dieren dit criterium zal halen, onze ervaring met deze modellen leert dat dit percentage in de praktijk onder de 5 % ligt.

#### **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 cumulatief ongerief schatten we in als matig.

### **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.

Dieren zullen uitgebreid worden onderzocht op macroscopische pathologie en tumoren zullen worden opgestuurd voor histologie. Verder zullen aangedane organen worden opgeslagen voor verder onderzoek (eiwit, RNA, DNA, en aneuploidie analyses)

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja

# Format DEC-advies

*Maak bij de toepassing van dit format gebruik van de bijbehorende toelichting, waarin elke stap in het beoordelingsproces wordt toegelicht*

## A. Algemene gegevens over de procedure

1. Aanvraagnummer: (Intern RUG code **8045**)

Titel van het project: **Ontwikkeling van aneuploidie-targeting therapie**

Titel van de NTS: **Zoeken naar aneuploidie specifieke kankertherapie**

2. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning

3. Contactgegevens DEC:

naam DEC : **DEC-RUG**

telefoonnummer contactpersoon: [REDACTED]

mailadres contactpersoon : [REDACTED]

4. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: **13-01-2016**
- aanvraag complete: **13-01-2016**
- in vergadering besproken: **22-01-2016**
- anderszins behandeld: **09-03-2016**
- termijnonderbreking(en) van / tot: **22-01-2016 tot 23-02-2016**
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met maximaal 15 werkdagen. **n.v.t.**
- aanpassing aanvraag: **23-02-2016**
- advies aan CCD: **15-03-2016**

5. 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 wel/niet geleid tot aanpassing van de aanvraag

6. Correspondentie met de aanvrager

- Datum: **22-01-2016**
- Strekking van de vraag / vragen:

**Gevraagd is om de primaire uitkomst parameters scherper te definiëren en om de aantallen benodigde dieren beter te motiveren. M.b.t. de MRI scans is gevraagd naar de praktisch uitvoerbaarheid en of er sprake is van een duidelijke fasering. Bij de beoogde behandeling wordt vooral achtergrond gegeven over de diverse cytostatica. Gevraagd is om dit beter te specificeren (welke doses, hoe bepaald, eerder werk, referenties). Er is verder gevraagd of een prioritering mogelijk zou zijn in de keuze van de weefsels waarin de therapie wordt getest. Hierbij zou weefsel met, naar verwachting, de meest succesvolle uitkomst voor wat betreft tumorinductie /therapie de eerste prioriteit moeten krijgen.**

-Datum antwoord: **23-02-2016**

Strekking van het (de) antwoord(en): **De gevraagde verduidelijkingen zijn verwerkt in het projectvoorstel en de bijlages. De antwoorden hebben geleid tot uitgebreide aanpassing van de aanvraag.**

7. 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 **Ja**.
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 **substantieel**.
4. De gekozen strategie en experimentele aanpak kunnen leiden tot het behalen van de doelstelling binnen het kader van het project. Naar de overtuiging van de DEC beschikt de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen om de projectdoelstelling met de gekozen strategie / aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren. **Ja, de experimenten die zijn voorgesteld zijn prima en gangbaar van opzet. Op deze wijze zal kennis over de behandeling van aneuploide tumoren verkregen worden. Aanvrager heeft ruime ervaring in dit veld en werkt samen met andere vooraanstaande wetenschappers. Waar nodig wordt kennis en expertise via samenwerkingen verkregen.**
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 onderzoekers gebruiken de muis, de keuze hiervoor is wetenschappelijk ruim voldoende onderbouwd**
6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. **Ja, die is realistisch ingeschat**
7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. **Nee. Dit werk kan in essentie alleen in levende, intacte organismen worden uitgevoerd**
8. In het project wordt optimaal tegemoet gekomen aan de vereiste van de **vermindering** van dierproeven. Het maximale aantal te gebruiken dieren lijkt realistisch ingeschat. De aanvrager beschikt over voldoende expertise en informatie om, bij wettelijk vereist onderzoek, te voorkomen dat onnodige duplicatie plaatsvindt. **Ja, het aantal dieren is beperkt tot wat**

**wetenschappelijk kan worden verantwoord. Beide geslachten worden gebruikt, experimenten worden via pilots gefaseerd uitgevoerd om het aantal te beperken en gedood in voorraad te minimaliseren**

9. Het project is in overeenstemming met de vereiste van de **verfijning** van dierproeven en het project is zo opgezet dat de behandeling van de dieren zo humaan mogelijk wordt uitgevoerd. Er is geen sprake van belangwekkende milieueffecten. **Ja, experimenten worden zodanig gedaan dat ongerief tot een minimum wordt beperkt. Aneuploidie wordt opgewekt in weefsels waarvan de verwachting is dat de muizen er relatief weinig last van hebben. De meeste kennis betreffende dit soort onderzoek bestaat en is verkregen in muizen. Er zijn geen belangwekkende milieueffecten te verwachten.**

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

## **D. Ethische afweging**

Twee van de drie tumoren zijn aneuploide, en het omliggende normale weefsel is dat niet. Het hier voorgestelde onderzoek biedt een uitstekend aanknopingspunt om therapieën of strategieën te ontwikkelen die specifiek op aneuploide cellen zijn gericht. De DEC acht de kans groot dat de beoogde doelstelling van het onderzoek gehaald wordt. Het mogelijke maatschappelijk belang is helder, kanker is een veel voorkomende ziekte met grote maatschappelijke, sociale en economische gevolgen. Betere, specifiekere behandelings-methoden zijn van groot belang. Onderzoek naar mogelijke therapieën die zich specifiek richten op aneuploide cellen en wat de gevolgen daarvan zijn voor een weefsel/organisme zijn een belangrijke en noodzakelijke stap naar nieuwe en betere therapie voor de mens. Dergelijk onderzoek is alleen uit te voeren in dieren, en met name in muizen waarin veel genetisch gemodificeerde stammen beschikbaar zijn. Het gebruik van de diersoort zoals hier benoemd is daarom te rechtvaardigen. Hoewel de dieren worden geschaad in hun belangen (ze ervaren eventueel ongerief door de experimentele handelingen) is dit door de onderzoekers zo veel mogelijk beperkt (zie hierboven. DE DEC oordeelt dan ook dat het

**wetenschappelijk en op termijn maatschappelijk belang van het onderzoek opweegt tegen het aangebrachte ongerief.**

## **E. Advies**

### 1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning te verlenen

Het uitgebrachte advies is gebaseerd op **consensus**.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan  
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  
AVD105002016466

**Bijlagen**

2

Datum 16 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte heer/mevrouw ,

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 16 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD105002016466. 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: 01179037  
Straat en huisnummer: A. Deusinglaan [REDACTED]  
Postcode en plaats: 9713AV GRONINGEN

Gegevens plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker

Naam: [REDACTED]  
Functie: Universitair docent  
Afdeling: [REDACTED]  
E-mailadres: [REDACTED]

Gegevens verantwoordelijke uitvoering proces

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

Gegevens gemachtigde

Postcode en plaats:

GRONINGEN

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 april 2016

Geplande einddatum:

31 maart 2021

Titel project:

Ontwikkeling van aneuploidie-targeting therapie

Titel niet-technische samenvatting:

Zoeken naar aneuploidie specifieke kankertherapie

Naam DEC:

DEC-RUG

Postadres DEC:

A. Deusinglaan 1, XXXXXXXXXX

E-mailadres DEC:

secrdec.umcg@umcg.nl

#### **Betaalgegevens**

De leges bedragen:

€ 935,-

De leges voldoet u:

na ontvangst van de factuur

#### **Checklist bijlagen**

Verplichte bijlagen:

- Projectvoorstel
- Beschrijving Dierproeven
- Niet-technische samenvatting

Overige bijlagen:

- Melding Machtiging
- DEC-advies

**Ondertekening**

Naam:

[REDACTED]

Functie:

[REDACTED]

Plaats:

GRONINGEN



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan

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  
AVD105002016466

**Bijlagen**

2

Datum 16 maart 2016

Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**

Factuurdatum: 16 maart 2016

Vervaldatum: 15 april 2016

Factuurnummer: 16700466

| Omschrijving   | Bedrag   |
|--|----------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD105002016466 | € 935,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan  
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**  
Aanvraagnummer  
AVD105002016466

**Uw referentie**  
uw ref

**Bijlagen**  
1

Datum 06 mei 2016

Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte

Op 16 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van aneuploidie-targeting therapie" met aanvraagnummer AVD105002016466. In uw aanvraag zitten voor ons nog enkele onduidelijkheden. In deze brief leest u wat wij nog nodig hebben en wanneer u een beslissing kunt verwachten.

**Welke informatie nog nodig**

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

**Onduidelijkheden**

1) In de Niet technische samenvatting heeft u de doelcategorie "Translationeel of toegepast onderzoek" aangekruist, terwijl dit in de projectaanvraag niet is aangekruist. Graag dit consistent maken.

2) In de NTS maakt u een onderscheid in ongerief licht tot ernstig. Dit onderscheid is niet weergegeven in uw projectvoorstel. In de bijlage onder vraag D beschrijft u dat de dieren worden behandeld voordat ze ongerief ondervinden van de tumoren, en de dieren minimaal ongerief zullen ondervinden. Kunt u het ongerief in het projectvoorstel nader opsplitsen en vermelden waardoor het ongerief ontstaat?

3) Onder vraag 3.4 Onderzoeksstrategie schrijft u dat u de kennis gegenereerd in het parallel ingediende projectvoorstel (AVD105002016465) zult gebruiken in de onderliggende aanvraag. In afwachting van een besluit op de aanvraag AVD105002016465, zou de huidige aanvraag kunnen starten, en in hoeverre kan deze worden uitgevoerd indien de parallelle aanvraag later of niet wordt vergund?

Wij vragen u deze informatie te verduidelijken.

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

**Datum**

06 mei 2016

**Onze referentie**Aanvraagnummer  
AVD105002016466**Opsturen binnen veertien dagen**

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

**Wanneer een beslissing**

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

**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



**Van:** [REDACTED]  
**Verzonden:** maandag 9 mei 2016 11:02  
**Aan:** Info-zbo; [REDACTED]  
**Onderwerp:** RE: AVD105002016466\_aanhouden.beoordelen  
**Bijlagen:** Bijlage\_1\_aanvraag [REDACTED].AVD105002016466.docx; NTS\_aanvraag  
 Foijer\_AVD105002016466.docx; Projectvoorstel\_aanvraag  
 Foijer\_AVD105002016466.docx

Beste [REDACTED],

Hierbij ontvangt U de aangepaste documenten met hieronder de toelichting over de aanpassingen.

U stelde de volgende vragen:

*1) In de Niet technische samenvatting heeft u de doelcategorie "Translationeel of toegepast onderzoek" aangekruist, terwijl dit in de projectaanvraag niet is aangekruist. Graag dit consistent maken.*

**Antwoord:** Dit is nu consistent gemaakt: in beide aanvragen staat fundamenteel en toegepast aangekruist.

*2) In de NTS maakt u een onderscheid in ongerief licht tot ernstig. Dit onderscheid is niet weergegeven in uw projectvoorstel. In de bijlage onder vraag D beschrijft u dat de dieren worden behandeld voordat ze ongerief ondervinden van de tumoren, en de dieren minimaal ongerief zullen ondervinden. Kunt u het ongerief in het projectvoorstel nader opsplitsen en vermelden waardoor het ongerief ontstaat?*

**Antwoord:** in de aangepaste bijlage\_1 is nu duidelijk onderscheid gemaakt in de categorieën licht, matig en ernstig en toegelicht hoe dit ontstaat.

*3) Onder vraag 3.4 Onderzoeksstrategie schrijft u dat u de kennis gegenereerd in het parallel ingediende projectvoorstel (AVD105002016465) zult gebruiken in de onderliggende aanvraag. In afwachting van een besluit op de aanvraag AVD105002016465, zou de huidige aanvraag kunnen starten, en in hoeverre kan deze worden uitgevoerd indien de parallelle aanvraag later of niet wordt vergund?*

**Antwoord:** Het merendeel van de aangevraagde dieren (500) zal gebruikt worden voor het testen van reeds gedefinieerde therapie die we willen testen op basis van al bestaande kennis ([REDACTED]). Deze proeven kunnen we uitvoeren onafhankelijk van de uitkomst van aanvraag AVD105002016465. De experimenten die afhangen van de kennis gegenereerd uit AVD105002016465 zijn pas voor de laatste 2 jaar van deze aanvraag gepland (200 dieren). We verwachten deze kennis dan reeds gegenereerd te hebben, wat inderdaad wel afhangt van het uiteindelijk toekennen van het werk voorgesteld in aanvraag AVD105002016465. Dit is nu beter toegelicht onder 3.4.3 van de projectaanvraag.

Zou U willen laten weten of U onze antwoorden en documenten in goede orde heeft ontvangen?

Alvast hartelijk dank en met vriendelijke groet

---

**Van:** Info-zbo [info@zbo-ccd.nl]

**Verzonden:** vrijdag 6 mei 2016 16:08

**Aan:** [REDACTED]

**CC:** [REDACTED]

**Onderwerp:** AVD105002016466\_aanhouden.beoordelen

Beste [REDACTED]

Bijgevoegde brief wordt u niet meer per post toegestuurd. In principe heeft u 14 dagen de tijd om de vragen te beantwoorden. Wij willen u echter vragen om uiterlijk donderdag 12 mei op de vragen te beantwoorden, zodat uw aanvraag in de eerstvolgende CCD vergadering besproken kan worden.

Met vriendelijke groet,

[REDACTED]

Centrale Commissie Dierproeven

---

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

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



## Format 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.

Elke celdeling wordt ons erfelijk materiaal gerepliceerd en verdeeld over de twee nieuwe ontstane dochtercellen. Soms maken cellen een fout bij het verdelen van de chromosomen en ontstaan er twee cellen met een afwijkende hoeveelheid DNA. Dit proces noemen we chromosomale instabiliteit; de cellen met afwijkende hoeveelheden chromosomen noemen we aneuploïde. Kankercellen maken dit soort van fouten frequent en **twee van de drie tumoren zijn dan ook aneuploïde**. Omdat de omliggende gezonde cellen zelden tot niet aneuploïde zijn, vormt aneuploïdie een veelbelovend aangrijppunt voor kankertherapie. Om tot zulke therapie te kunnen komen, moeten we eerst beter begrijpen waarom de meeste kankers aneuploïde zijn en dus wat de gevolgen zijn van aneuploïdie voor het ontstaan van kanker.

Hiertoe zijn in de afgelopen 15 jaar diverse muismodellen gemaakt waarin systemisch (dus in alle weefsels van de muis) aneuploïdie werd geprovoceerd. In deze modellen werden genen uitgeschakeld in het 'mitotic spindle checkpoint', een mechanisme dat in mitose bepaalt of alle chromosomen correct gebonden zijn aan de mitotische spoel. Het inactiveren van dit mechanisme leidt tot frequente fouten in de chromosoomverdeling en dus tot aneuploïdie. Het systemisch inactiveren van genen in het mitotic spindle checkpoint leidt in alle gevallen tot vroege embryonale letaliteit (~E6.5). Heterozygote dieren lieten milde aneuploïdie zien en in sommige gevallen een iets verhoogde frequentie van kankers (als de dieren een kankerpredispositie lieten zien, ontwikkelde ongeveer 1/3 van de dieren tumoren na 18-24 maanden) (zie voor review: ██████████). In veel gevallen waren deze dieren wel gevoeliger voor geïnduceerde kankers (bijvoorbeeld door het inactiveren van ██████ of het blootstellen aan carcinogene stoffen). Samengevat hebben deze modellen ons geleerd dat chromosomale instabiliteit kanker versnelt maar dat het (in de muis) geen primaire oorzaak is van kanker. Verder lieten enkele van de modellen versnelde veroudering zien, wat suggereert dat aneuploïdie ook gerelateerd is aan veroudering. Ondanks dat deze modellen wel de relatie tussen aneuploïdie, kanker en veroudering hebben geschetst, zijn deze modellen minder geschikt om de moleculaire gevolgen van aneuploïdie in kanker te onderzoeken, omdat de tumoren in deze modellen zeldzaam zijn, in diverse weefsels ontstaan en pas laat in het leven van de muis. Om in deze modellen de gevolgen van aneuploïdie in kaart te brengen zouden onnodig veel dieren nodig zijn.

Wij hebben daarom conditionele knockout (cKO) muizen gemaakt, waarin we in weefsels naar keuze het mitotic spindle checkpoint kunnen uitschakelen (█████2 cKO) of verzwakken (█████ cKO). Middels deze modellen onderzoeken we wat te moleculaire gevolgen zijn van aneuploïdie voor weefselontwikkeling, en verder hoe aneuploïdie leidt tot kanker. In deze modellen kunnen we ernstige aneuploïdie veroorzaken op weefselniveau en op deze wijze hebben we een tumormodel (T-cell acute lymphoblastic lymphoma) kunnen ontwikkelen, waarin 100% van de muizen binnen 3 maanden (████████████████████) (████████████████████) of 4 maanden (████████████████████) (████████████████████) aneuploïde lymphomen ontwikkelen. Dankzij deze modellen hebben we een zeer reproduceerbaar en gedefinieerd tumorcohort kunnen genereren, en kunnen we beter de moleculaire gevolgen van aneuploïdie in kaart brengen.

Zoals de eerdere modellen al suggereerden, laten ook onze modellen zien dat chromosomale instabiliteit alleen niet voldoende is voor kanker. We hebben dit

laten zien in T-cellen ( ), de lever ( ) en de huid ( ), wat aangeeft dat aneuploïde cellen nog extra mutaties nodig hebben om te transformeren in aneuploïde kankercellen. Daarnaast hebben we gevonden dat verschillende celtypen op verschillende wijze omgaan met aneuploïdie. Zo blijken T-cellen ( ), levercellen ( ) en basal epidermal cells ( ) vrij goed tegen aneuploïdie te kunnen, in tegenstelling tot bijvoorbeeld de bulge stamcellen van de huid, die in de haarfollikel liggen ( ). Dit laatste type cellen gaat net als cellen in weefselweek relatief snel dood (Kops et al, PNAS, 2004 Jun 8;101(23):8699-704) t.g.v. aneuploïdie. Dit geeft aan dat de verschillende celtypen op verschillende wijze omgaan met aneuploïdie en benadrukt het belang van weefselspecifieke knockouts om the komen tot therapieën die selectief aneuploïde kankers aanpakken.

### 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?

Twee van de drie kankers is aneuploïde en de afgelopen 15 jaar zijn er dan ook diverse muismodellen gegenereerd om te onderzoeken hoe aneuploïdie kan leiden tot kanker. Tot nu toe waren dit alleen conventionele knockout muismodellen (knockout in alle lichaamcellen; zie voor review bijv.: (Schvartzman J-M, et al Nat Rev Cancer; 2010; 10:102–15) waarbij grootschalige aneuploïdie zonder uitzondering leidde tot vroege embryonale letaliteit (<E8.5). Heterozygote inactivatie van de bestudeerde genen leidde tot zwakke tumorfenotypes, waarbij ~30% van de dieren aan het einde van hun leven (18-24 maanden) tumoren kregen in diverse weefsels. Daarom lenen deze modellen zich er niet voor om gestructureerd de fysiologische gevolgen van aneuploïdie in kanker te onderzoeken.

Paradoxaal genoeg leidt aneuploïdie in weefselweek tot een groeinadeel, niet een groeivoordeel (Kops GJPL et al, Proc Natl Acad Sci USA. 2014;101:8699–704); (Williams BR, et al Science; 2008; 322:703–709). Dit suggereert dat aneuploïde kankercellen zich aan hebben weten te passen aan de nadelen van aneuploïdie. Dit betekent ook, dat als we beter begrijpen hoe aneuploïde kankercellen omgaan met de (nadelige) gevolgen van aneuploïdie, we mogelijk kunnen komen tot manieren om aneuploïde kankercellen selectief te doden, het lange-termijn doel in mijn lab. Daarvoor moeten we in eerste instantie beter begrijpen hoe kankercellen en niet-kwaadaardige cellen omgaan met aneuploïdie. Hiervoor hebben we conditionele knockout allelen gegenereerd (voor en ) waarmee we aneuploïdie kunnen provoceren op weefselspecifiek niveau. Deze modellen stellen ons, in tegenstelling tot de vroegere modellen, in staat om gestructureerd te onderzoeken hoe weefsels en tumoren omgaan met aneuploïdie en hoe dit leidt tot kanker ( In een in parallel ingediend projectvoorstel onderzoeken hoe cellen aneuploïde worden, hoe aneuploïdie cellen helpt om kwaadaardig te worden en wat de fysiologische gevolgen zijn van aneuploïdie. Om uiteindelijk te komen tot nieuwe therapie die aneuploïdie gebruikt om kankercellen te doden stellen we in dit project de **volgende vraag**:

1. Hoe kan aneuploïde kanker specifiek bestreden worden? Twee van de drie kankers zijn aneuploïde. Het selectief doden van aneuploïde cellen is dus, in theorie, een hele effectieve manier om kanker te bestrijden. Helaas zijn hiervoor nog geen geneesmiddelen beschikbaar. Dat het selectief doden van aneuploïde cellen in principe mogelijk is, heeft ons eigen werk en dat van onze collega's al eerder laten zien in een proof of principle experiment. Aneuploïdie leidt namelijk tot een ontregeling van het metabolisme en de eiwithuishouding. Deze ontregeling kan worden verergerd door weefselweekcellen te behandelen met de . Aneuploïde cellen blijken in weefselweekexperimenten namelijk gevoeliger voor behandeling dan niet aneuploïde cellen (Tang et al, Cell. 2011:144(4):499-512). Wij hebben deze bevindingen in kweek bevestigd en willen dit nu valideren in onze muismodellen voor aneuploïde kanker. Zo willen we de effectiviteit van vergelijken met de effectiviteit van bestaande

therapieën zoals [REDACTED]. Daarnaast zullen de experimenten beschreven in het in parallel ingediende projectvoorstel leiden tot verder begrip van hoe kankercellen zich aanpassen aan de nadelen van aneuploidie. Als we beter weten hoe cellen in de diverse weefsels zich aanpassen aan aneuploidie, dan kunnen we hierop ingrijpen met small molecule compounds (vergelijkbaar als [REDACTED]) en daarmee de aneuploïde cellen mogelijk specifiek doden. Dergelijke kandidaat compounds zullen eerst uitgebreid in celweek getest worden, maar willen we uiteindelijk ook testen in onze muismodellen voor aneuploïde kanker om het te bewijzen mechanisme *in vivo* te valideren. Belangrijk om te vermelden is ook dat het testen van deze compounds geen systematische screening van compounds vanuit de farma betreft, maar gericht gekozen compounds die selectief pathways targetten zoals [REDACTED] of compounds te ontdekken vanuit ons andere projectvoorstel en dienen om het moleculair mechanisme beter te begrijpen.

**Haalbaarheid:** De hierboven benoemde vraag kunnen we beantwoorden met de dierexperimenten beschreven in dit voorstel. Voor de gestelde vraag zijn de modellen al beschikbaar, of kunnen we de modellen genereren samen met [REDACTED] [REDACTED]. In dit voorstel zullen we interfereren met processen die van aneuploïdie cellen een kanker cel maken om aneuploïde kanker te bestrijden. Dit zal in eerste instantie gebeuren middels bekende kankertherapeutica, dosering en protocol zijn dus bekend, maar deze therapeutica zijn nog nooit specifiek op dit soort van diermodellen getest. Dit levert dus kennis op over de efficiëntie van deze therapeutica in de behandeling van aneuploïdie tumoren. Daarnaast biedt het de mogelijkheid om onze modellen te valideren voor dit soort van preklinische tests. Het door ons in parallel ingediend projectvoorstel zal leiden tot nieuwe therapeutica die aneuploïde cellen kunnen doden. Alvorens we dit soort van kandidaat compounds in de muis zullen testen, zullen we, zoals aangegeven, deze eerst uitgebreid *in vitro* testen (zoals we reeds doen voor [REDACTED] als beschreven in Tang et al).

### 3.3 Belang

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

Het primaire belang van dit onderzoek is wetenschappelijk. 2 van de 3 kankers zijn aneuploïde. Ondanks dit gegeven, zijn er nog geen therapieën beschikbaar die selectief aneuploïde cellen kunnen bestrijden, terwijl aneuploïde zo'n belangrijk onderscheidende factor van 'gezonde' lichaamcellen is. Om tot dergelijke therapie te komen, moeten we eerst beter begrijpen hoe cellen en weefsels omgaan met aneuploïdie, kennis die we vergaren vanuit een parallel ingediend projectvoorstel. Dit doen we waar mogelijk met celweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celweek vaak anders op aneuploïdie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploïdie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploïdie in diermodellen de onderzoeken. Onze modellen zijn wereldwijd uniek en hebben al belangrijke resultaten opgeleverd over aneuploïdie en de gevolgen daarvan. In deze experimenten werken we deze bevindingen verder uit en komen we stap voor stap steeds dichterbij mogelijke therapieën die selectief aneuploïde cellen kunnen doden, welke zeer belangrijk kunnen worden in de behandeling van 2 van de 3 kankers, maar mogelijk ook kunnen helpen veroudering beter te begrijpen om uiteindelijk de gevolgen van het ouder worden te kunnen vertragen (healthy ageing), twee zeer belangrijke maatschappelijke belangen. Dit doen we waar mogelijk met celweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celweek vaak anders op aneuploïdie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploïdie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploïdie in diermodellen de onderzoeken.

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Het doel van deze aanvraag is komen tot manieren om aneuploïde (kanker)cellen selectief te doden. Hiertoe nemen we de volgende benaderingen:

- 1) We zullen onze bestaande muismodellen voor aneuploïde kanker behandelen met bestaande therapeutica (bijv. ██████████) om te kijken of er verschillen zijn in de uitkomst bij middelen die DNA schade provoceren (zoals ██████████) en middelen die chromosomale instabiliteit veroorzaken/verergeren (██████████). Aangezien deze middelen in de kliniek toegepast worden is dosering en toxiciteit bekend.
- 2) We zullen onze bestaande muismodellen voor aneuploïde kanker gebruiken om de nieuw gevonden aneuploïdy targeting compounds ██████████ te testen in hun effectiviteit om aneuploïde kanker te genezen.
- 3) We zullen de kennis gegenereerd vanuit het in parallel ingediend projectvoorstel benutten om te komen tot nieuwe therapeutica die aneuploïde cellen selectief doden, welke we zullen testen in onze muismodellen voor aneuploïde kanker, zoals beschreven onder benaderingen 1 en 2.

Samenvattend zullen we, gebruikmakend van de kennis gegenereerd in het in parallel ingediend projectvoorstel, onze muismodellen eerst valideren voor het preklinisch testen van kankertherapeutica, om daarna deze muismodellen te gebruiken voor het feitelijk preklinisch testen van te valideren en nieuw te ontdekken aneuploïdie-targeting therapeutica.

---

#### 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 dit project stellen we 1 hoofdvraag:

1. Hoe kan aneuploïde kanker specifiek bestreden worden?

Deze vraag zullen we beantwoorden middels 1 dierproeftype:

- Interventiemodellen voor aneuploïde kanker.

---

#### 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.

---

In dit voorstel zullen we bestaande kennis uit mijn lab en nieuw te genereren kennis omzetten in therapie. Voor de bekende in vivo te valideren compounds (██████████) kunnen we direct beginnen, omdat het mechanisme van deze middelen bekend is en we deze middelen uitgebreid in vitro getest hebben (benaderingen 1 en 2 onder 3.4.1). In de eerste twee jaar zullen we dan ook beginnen met het testen van ██████████ behandeling (in vergelijking met ██████████) van aneuploïde kankers (om de aneuploïdie zelf de verergeren) om te testen of dit in geval van aneuploïde kankers juist een goed (cellen gaan dood) of slecht (aneuploïde cellen kunnen goed tegen aneuploïdie) idee is. Voor deze compounds zijn farmacokinetiek en -dynamiek in de muis bekend. In parallel zullen we testen of het ontregelen van het tumormetabolisme (██████████; wordt gebruikt bij herstel na hartoperaties in de mens, dosering dus afleidbaar) of het ontregelen van de heatshock response ██████████ een goede behandeling is voor aneuploïde tumoren. Daarnaast zullen we de eerste 3 jaar benutten om de effectiviteit van Prmt5 inhibitors en ██████████ te testen in onze aneuploïde tumor modellen. Ook deze middelen zijn al eerder in de muis gebruikt, maar nog nooit in de behandeling van aneuploïde kanker.

Het werk in mijn lab richt zich erop biologische processen bloot te leggen die aneuploïde cellen nodig hebben om maligne te worden (nieuw te genereren kennis). Deze processen zullen we chemisch gaan remmen of juist harder aanzetten om zo de aneuploïde kankercellen te doden in onze muismodellen voor aneuploïde kanker. Deze experimenten zullen we pas starten als 1) we de werking van deze nieuw te ontdekken compounds uitgebreid in weefselkweek

gevalideerd hebben, 2) er gevalideerde kandidaatgenen hebben uit de voorgaande vragen en 3) als de compounds veilig in de muis gebruikt kunnen worden (literatuurstudie of toxiciteitstesten). In het geval van nieuw te vinden compounds zullen we dan ook pas vanaf ongeveer jaar 3 kunnen beginnen.

---



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

| Volgnummer | Type dierproef                             |
|------------|--|
| 1          | Interventiemodellen voor aneuploïde kanker |
| 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.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          | Interventiemodellen voor aneuploide kanker |

*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.

In dit type dierproef zullen we onze opgedane kennis over welke processen van aneuploide cellen aneuploide kankercellen maken valideren door dieren met aneuploide tumoren te behandelen met therapeutica die selectief aneuploide cellen doodmaakt. Deze experimenten dienen om 1) te valideren of onze muismodellen voor aneuploide kanker geschikt zijn als preklinische modellen, 2) om te kijken welke bestaande chemotherapeutica het meest geschikt zijn om aneuploide kanker te behandelen, en 3) om nieuwe middelen die selectief aneuploide kankercellen doden in celweek in vivo te valideren. Hiervoor maken we gebruik van onze krachtige T-ALL tumormodellen: aneuploide [REDACTED] T-ALL, [REDACTED] aneuploide T-ALL en controle (niet aneuploide) [REDACTED] T-ALL. In alle drie deze genotypes ontstaan tumoren in de thymus 3-5 maanden na geboorte, waarbij de eerste 2 genotypes aneuploide tumoren geven. We zullen in

deze dieren middels een genetische fluorescente reporter (Rosa-STOP-LOX-STOP-Tomato) alle knockout T-cellen rood labelen. Op deze wijze kunnen we middels de IVIS bodyscanner zien of de dieren al tumoren hebben ontwikkeld. Dieren met een beginnende tumor zullen dan behandeld gaan worden met de verschillende therapeutische regimes die ons onderzoek voorspelt te werken voor aneuploide kankers.

De primaire uitleesparameters voor dit dierproeftype zijn:

- tumorgrootte (te bepalen middels bloedmetingen en door de IVIS scanner (de tumoren zijn fluorescent gelabeld met een reporter gen). We zullen de tumorontwikkeling volgen in de tijd en in relatie tot de diverse te testen therapeutica. In een enkel geval zullen we dieren ook met MRI meten.
- tumor differentiatie/type: dit zullen we meten met flowcytometrie
- aneuploidie: we zullen de tumoren regelmatig valideren op aneuploidie middels metaphase spreads, interphase FISH en single cell sequencing. We zullen ook kijken of de aneuploidie verandert in tumoren die therapieresistent worden.
- tumor transcriptoom: we zullen kijken hoe de tumoren reageren op therapie en hoe de transcriptomen veranderen als de tumor resistent terugkomt.
- tumorgenoom: in geval van resistente tumoren zullen we mogelijk gaan kijken welke mutaties hieraan hebben bijgedragen met whole genome sequencing.

Beschrijf de beoogde behandeling van de dieren (inclusief de aard, de frequentie en de duur van de behandelingen waaraan de dieren worden blootgesteld) en onderbouw de gekozen aanpak.

De dieren zullen worden behandeld met drie 'types' therapeutica. Het eerste type betreft gevalideerde therapeutica die reeds gebruikt worden in de kliniek tegen kanker (bijvoorbeeld ██████████). In dit type experiment willen we kijken welk type bestaande therapie het beste werkt op aneuploide tumoren, met name omdat bepaalde therapie juist werkt door cellen ██████████) en de vraag is of dit een goed idee is bij aneuploide tumoren die al goed om kunnen gaan met aneuploidie of dat deze tumoren beter behandeld kunnen worden met DNA-schade inducerende compounds zoals ██████████

Type twee zijn therapeutica die wel gebruikt worden in de kliniek, maar nog niet in de bestrijding van kanker (bijv. ██████████). De dosering is hiervan bekend, maar het effect op (aneuploide) kanker nog niet. Een ander voorbeeld is ██████████ waar wij van denken dat het heel effectief zal zijn in de bestrijding van aneuploide T-cel lymphomen.

Het derde type therapeutica betreft nieuw te vinden middelen uit ons onderzoek in mijn lab. Deze therapeutica zullen we alleen gaan gebruiken als we de werkbare doet in de muis kennen (nieuwe compounds, door anderen in muizen of klinische trials getest). Zo willen we graag binnenkort een Prmt5 inhibitor gaan testen in onze modellen, omdat ██████████ belangrijk lijkt te zijn voor de activatie van de mTOR pathway en sterk opgereguleerd in in al onze aneuploide T-cel lymphomen.

Behandeling/ experiment opzet:

Voor elk experiment (type 1, 2 of 3) zullen we de benodigde experimentdieren (aneuploid T-cel lymphoom) en controle dieren (niet-aneuploide T-cel lymphoom) tumoren laten ontwikkelen. Deze tumoren zullen gelabeld zijn met een fluorescent reporter gen (Rosa26-stop-lox-stop-Tomato), zodat we de tumoren zodra ze ontstaan kunnen meten in de IVIS bodyscanner. Zodra we de tumoren kunnen meten (primaire tumor), zullen de muizen behandeld worden met muis-geoptimaliseerde doses\* (1 week behandeling, om de dag IP of IV injectie) van de te testen compounds. Tumorgrootte (en dus therapierespons) zal dan bepaald worden met de IVIS bodyscanner (meting ongeveer 1 x per week) en in enkele gevallen middels muis-MRI. Voor dit laatste zijn we momenteel aan het valideren of dit bovenop de IVIS scans toegevoegde waarde heeft. Indien de tumoren niet verdwijnen binnen 1-2 weken, zullen dieren

direct worden opgeofferd (non-respons). Tumoren zullen uitgebreid worden geanalyseerd middels de hierboven beschreven uitleesparameters. Indien de tumoren wel verdwijnen, zullen dieren gevolgd worden voor het ontstaan van recidief tumoren wederom door 1 x per week fluorescentie te meten in de IVIS bodyscanner. Indien geen recidief ontreedt, zullen de muizen maximaal 3 maanden gevolgd worden met IVIS imaging en dan worden opgeofferd (behandeling is curatief). Muizen met recidief worden of direct opgeofferd (gevolgd door uitgebreide analyse: recidieftumoren) of eventueel opnieuw behandeld worden om eventueel opgetreden therapie-resistentie te meten (zie ook onder B 'aantallen dieren'). Als de tumoren niet verdwijnen door recidief therapie (~2 weken behandeling) zullen dieren opgeofferd worden (therapieresistent recidief). Dieren waarbij het recidief wel verdwijnt, zullen ook gevolgd worden met IVIS imaging (1x per week) tot er weer een tumor ontstaat (waarop uitgebreide analyse gedaan zal worden; tweede recidief) of voor maximaal 3 maanden na de laatste behandeling (behandeling curatief).

\* Voor de behandeling van de dieren zullen we dosering gebruiken zoals gebruikt in relevante literatuur: In geval van [REDACTED] is dit 0.5 mg/kg (Li et al, J Clin Invest. 2015 Mar 2;125(3):1081-97), in geval van [REDACTED] is dit tot 30 mg/kg [REDACTED], voor [REDACTED] 25mg/kg (Sharp et al, Am J Physiol Renal Physiol. 2016 Jan 6:ajprenal.00512.2015), voor [REDACTED] 300 mg/kg (Zhou et al, Innate Immun. 2015 Oct;21(7):698-705) en voor [REDACTED] ~20 mg/kg mg/kg (Shi et al, J Hematol Oncol. 2016 Feb 18;9(1):12), (Siman et al, PLoS One. 2015 Nov 5;10(11):e0142340), en (Cullion et al, Blood. 2009 Jun 11;113(24):6172-81).

---

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

Per therapie willen we de respons in totaal 20 experiment dieren vergelijken met die in 20 controle dieren. Dit getal volgt een power-analyse. In dit geval is de variatiecoëfficiënt sigma vooraf niet bekend; de proefgrootte wordt daarom afgelezen van een uit Owen afgeleide grafiek (Proefdieren en Dierproeven, L.F.M van Zutphen, vijfde druk, 2009, blz 211). Voor dit experiment stellen we een onbetrouwbaarheidsdrempel (alpha) van 0.05 of een power (pi) van > 0.8 en een verhouding tussen het te meten verschil ( $\mu_1 - \mu_2$ ) en variatiecoëfficiënt op ongeveer 1.5. Dit laatste betekent dat er bij een spreiding van ongeveer 2 maanden in de overleving binnen 1 groep een significant verschil gemeten wordt als de gemiddelde overleving tussen experiment en controlegroep minimaal 3 maanden uit elkaar ligt; een spreiding van ongeveer 2 maanden binnen een cohort is gemiddeld binnen onze bestaande T-ALL muismodellen. Er valt dan uit de grafiek af te lezen dat de proefgrootte ongeveer 20 dieren dient te zijn.

Echter, omdat we van te voren niet zeker weten of een therapie enig effect geeft, zullen we voor iedere therapie eerst een pilot uitvoeren op 5 aneuploide en 5 niet aneuploide dieren om globaal de tumorrespons te meten. Dieren zullen worden opgeofferd zodra de tumoren terugkomen of niet verdwijnen. Op deze wijze leren we ook al iets over de latentie van een mogelijk recidief. Als de therapie lijkt te werken, zullen we een groter cohort testen (go/no-go keuzemoment). We zullen dan 15 extra aneuploide en 15 extra niet aneuploide dieren behandelen met de therapie. Van deze uitgebreidere groepen zullen we 10 aneuploide/niet aneuploide dieren opnieuw behandelen om therapieresistentie te bepalen, de overige 5 zullen direct worden opgeofferd als de tumor is teruggekomen. Op deze wijze kunnen we voor 10 muizen per therapie materiaal verzamelen van een primair recidief en in 10 muizen kijken of dit recidief resistent geworden is voor therapie. Tumoren zullen worden onder meer geanalyseerd op (extra) mutaties, transcriptoomveranderingen en aneuploidie zoals beschreven onder de primaire uitkomstparameters.

---

## B. De dieren

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

Alle experimenten zullen worden uitgevoerd op transgene muizen. We maken gebruik van mannen en vrouwen, omdat we geen verschil verwachten tussen de sexes. Voor dit type dierproef zullen alleen volwassen muizen uit eigen fok (heel soms bestellen we dieren vanuit extern, zoals van [REDACTED]) gebruikt worden, in sommige gevallen zullen dieren als jong volwassene al behandeld worden op Cre te activeren. Binnen dit type dierproef zullen we de volgende

cohorten volgen:

Per te testen therapie zullen we 40 dieren gebruiken; 10 voor de pilot (5 per genotype) en 30 (15 per genotype), voor het uiteindelijke experiment (zie voor motivatie pilot en uiteindelijk experiment onder statistische methoden).

We willen de volgende behandelingen testen:

- ██████████ (om te testen of verergeren van chromosomale instabiliteit aneuploide tumoren doodt en of dit eerder leidt tot resistente tumoren met als controle ██████████ behandelde dieren. (3 x 40 = 120 dieren; type 1).
- ██████████ om te testen of aneuploide tumoren slechter tegen ██████████ kunnen dan niet aneuploide tumoren (40 dieren, type 2).
- ██████████ om te testen of aneuploid T-cell lymfoom gevoeliger is dan niet aneuploid T-cell lymfoom voor ██████████ (40 dieren, type 2).
- Nader te bepalen compounds, te identificeren uit werk komende jaren, schatting 5 compounds: 200 dieren (type 3).

Subtotaal: 400 dieren

Voor dit type dierproef hoeven geen nieuwe stammen te worden gegenereerd. Wel moeten we de ██████████, de ██████████ en de ██████████ T-ALL lijnen aanhouden, dit is fok met ongerief omdat een op de vier van de muizen T-cell lymfoom ontwikkelt.

Per jaar worden beide stammen 4 x gefokt en krijgen we ongeveer 20 nakomelingen per stam. Per jaar leidt dit dus tot 20 dieren met ongerief (4 x fokken, 20 nakomelingen per fok, 1 op de vier aangedaan), dus 100 dieren in totaal per stam voor de 5 jaar van deze aanvraag. Aangezien we 3 stammen met ongerief aanhouden vragen we hiervoor 300 dieren aan voor de loop van de aanvraag.

Subtotaal 300 dieren.

Totaal vragen we aan voor dit type dierproef: 700 dieren.

---

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

---

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

Nee

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

#### **D. Vervanging, vermindering en verfijning**

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

Waar mogelijk doen we onze experimenten met celkweekexperimenten, maar het blijkt dat cellen in celkweek vaak anders op aneuploidie reageren dan cellen in hun eigen fysiologische niche. Daarom, om tot aneuploidie-selectieve therapie te komen, is het van cruciaal belang om aneuploidie in diermodellen te onderzoeken.

Alle compounds en behandelingen zullen eerst uitgebreid getest en gevalideerd worden in weefselkweek voordat ze in diermodellen getest zullen worden (vervanging en vermindering). We kiezen voor het testen van therapeutica bewust het T-ALL model, omdat het snel en reproduceerbaar is, waardoor we de latentie goed kunnen voorspellen (verfijning). Daarnaast labelen we de tumoren met een marker, zodat we de tumoren in een vroeg stadium kunnen zien, wat ongerief vermindert. Dit alles dient ter verfijning van de strategie. Verder gebruiken we binnen elk cohort dieren om te kijken of de tumor bestreden kan worden, of de tumor terugkomt en of de teruggekomen tumor resistent is geworden. Hiermee beantwoorden we drie vragen per therapie middels 1 cohort (vermindering).

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

Dieren zullen behandeld worden voordat ze ongerief ondervinden van de tumoren. Aangezien we dit model goed kennen en we de tumoren met IVS en mogelijk ook enkele dieren met MRI zullen visualiseren, zullen de dieren minimaal ongerief ondervinden. Omdat we de dosering van de therapeutica baseren op literatuurwaarden kunnen we eventuele bijwerkingen van de therapeutica tot een minimum beperken. Deze bijwerkingen leiden meest waarschijnlijk in eerste instantie tot gewichtsverlies, iets wat we nauwgezet zullen volgen door de dieren regelmatig te inspecteren (minimaal 2 keer per week door onderzoeker en dagelijks door diervoorzorging).

### **Herhaling en duplicering**

#### **E. Herhaling**

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

Deze proeven zijn nog niet eerder uitgevoerd. Hiervoor hebben we een uitgebreide zoekopdracht op PubMed uitgevoerd en daarnaast gesproken met onze diverse collega's die dit soort modellen ontwikkelen

### **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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

We zullen de dieren behandelen voor ze ernstig ziek worden van de (aneuploide) bloedkankers. We kennen de latentie van deze modellen goed en kunnen zo ongerief minimaliseren. Onze ervaring met dit model heeft ons geleerd dat de dieren geen ongerief hebben van de beginnende tumoren. In tweede instantie kunnen na behandeling opnieuw tumoren ontstaan die resistent zijn. Dit kan dit beginnend ongerief leiden wat zich op dezelfde wijze zal uiten als de bij ons bekende primare tumoren (kortademigheid, gewichtsverlies). Verder kunnen eventuele bijwerkingen van de therapie leiden tot gewichtverlies (tijdelijk verlies functionaliteit darmepitheel).

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

Het meeste ongerief komt door de lymfomen die zullen ontstaan. Verder is er mild ongerief door de non-invasieve IVIS of MRI imaging. Tenslotte kunnen dieren ongerief ontwikkelen door de toe te passen therapeutica (verlies microvilli in darm door afdoden delende cellen (bijv. ██████████

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

Dieren zullen zeer regelmatig (minimaal 2 maal per week) uitgebreid geïnspecteerd worden door de onderzoekers en als dat we de tumoren verwachten 1 x per week met de IVIS worden bekeken. Enkele dieren zullen met MRI gescand worden afhankelijk van een momenteel lopende pilot in het lab. Daarnaast worden de dieren dagelijks door de diervoorzorging gecontroleerd. Dieren zullen worden behandeld met de te testen therapie of worden opgeofferd zodra ze het eerste meetbare ongerief van de kankers krijgen (toename fluorescent signaal op IVIS, gewichtsverlies, bleekheid ('witte oren'), kortademigheid). Bij dieren die therapie krijgen zal extra worden opgelet of ze nadelige effecten van de middelen ondervinden zoals gewichtsverlies. Om dit laatste type ongerief zoveel mogelijk te voorkomen zullen de dosering van de middelen aanpassen op de waarden genoemd in de literatuur, waar mogelijk en dieren extra te monitoren tijdens de behandeling. Tenslotte zullen dieren worden opgeofferd als de therapie niet aanslaat (bij geen respons binnen 2 weken na start therapie).

#### 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 de minderheid van de gevallen zullen dieren dusdanig ernstig ziek worden dat de op basis van humane eindpunten opgeofferd dienen te worden. Dit zal zijn als de dieren moribund zijn, lethargisch zijn, >20% van hun gewicht verloren zijn of ernstige (vecht)wonden hebben.

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

We streven ernaar dat zo min mogelijk dieren dit criterium zal halen, onze ervaring met deze modellen leert dat dit percentage in de praktijk onder de 5 % ligt.

#### 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 cumulatief ongerief schatten we in als matig.

### 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.

Dieren zullen uitgebreid worden onderzocht op macroscopische pathologie en tumoren zullen worden opgestuurd voor histologie. Verder zullen aangedane organen worden opgeslagen voor verder onderzoek (eiwit, RNA, DNA, en aneuploidie analyses)

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.



Ja



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Rijksuniversiteit Groningen

A. Deusinglaan  
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  
AVD105002016466  
**Bijlagen**

1

Datum 17 mei 2016  
Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte

Op 16 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Ontwikkeling van aneuploidie-targeting therapie" met aanvraagnummer AVD105002016466. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 9 mei 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. Op ons verzoek heeft u de NTS en het projectvoorstel consistent gemaakt in de doelcategorie van het onderzoek, is de ongeriefsclassificatie verhelderd en is uw strategie indien de parallel ingediende aanvraag (AVD105002016465) niet vergund zou worden verhelderd.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De algemene voorwaarde betreffende afstemming van de go/no go momenten met de IvD wordt gesteld om onnodige inzet van dieren in proeven te voorkomen.

De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1 sub a 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 "Ontwikkeling van aneuploidie-targeting therapie" starten. De vergunning wordt afgegeven van 17 mei 2016 tot en met 31 maart 2021.

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 15 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van de wet. Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering. Wel stellen wij enkele algemene voorwaarden. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

**Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

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

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

**Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:



M. G. de Peuter  
Algemeen Secretaris

**Bijlagen:**

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

## Projectvergunning

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Rijksuniversiteit Groningen

Adres: A. Deusinglaan [REDACTED]

Postcode en plaats: 9713AV GRONINGEN

Deelnemersnummer: 10500

deze projectvergunning voor het tijdvak 17 mei 2016 tot en met 31 maart 2021, voor het project "Ontwikkeling van aneuploidie-targeting therapie" met aanvraagnummer AVD105002016466, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC-RUG. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Universitair docent. Voor de uitvoering van het project is Universitair docent verantwoordelijk.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 16 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 9 mei 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 9 mei 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 15 maart 2016, ontvangen op 16 maart 2016.
  - d De aanvullingen op uw aanvraag, ontvangen op 9 mei 2016

| Naam proef                                 | Diersoort/ Stam                            | Aantal dieren | Ernst | Opmerkingen |
|--|--|---------------|-------|-------------|
| Interventiemodellen voor aneuploïde kanker | Muizen ( <i>Mus musculus</i> ) / Tg muizen | 700           | Matig |             |

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

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

niet meer of slechts in verminderde mate in staat is pijn te tonen, wanneer het dier niet tegelijkertijd voldoende 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.

| Inventaris Wob-verzoek W16-16S |  |                 |      |        |       |                   |        |        |      |
|--------------------------------|--|-----------------|------|--------|-------|-------------------|--------|--------|------|
|                                |  | wordt verstrekt |      |        |       | weigeringsgronden |        |        |      |
| nr.                            | document                                   | reeds openbaar  | niet | geheel | deels | 10.1.c            | 10.2.e | 10.2.g | 11.1 |
|                                | <b>NTS2016467</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                              | Bijlage beschrijving dierproeven 3 oud     |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 7                              | DEC-advies                                 |                 |      |        | x     |                   |        | x      |      |
| 8                              | Ontvangstbevestiging                       |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 9                              | Verzoek aanvulling aanvraag                |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 10                             | Projectvoorstel herzien                    |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 11                             | Niet-technische samenvatting herzien       | x               |      |        |       |                   |        |        |      |
| 12                             | Bijlage beschrijving dierproeven 1 herzien |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 13                             | Bijlage beschrijving dierproeven 2 herzien |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 14                             | Bijlage beschrijving dierproeven 3 herzien |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |
| 15                             | Advies CCD                                 |                 | x    |        |       |                   |        |        | x    |
| 16                             | Beschikking en vergunning                  |                 |      |        | x     |                   | x      | x      |      |



## Aanvraag Projectvergunning Dierproeven Administratieve gegevens

- U bent van plan om één of meerdere dierproeven uit te voeren.
- Met dit formulier vraagt u een vergunning aan voor het project dat u wilt uitvoeren. Of u geeft aan wat u in het vergunde project wilt wijzigen.
- Meer informatie over de voorwaarden vindt u op de website [www.centralecommissiedierproeven.nl](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?<br><i>Neem voor meer informatie over het verkrijgen van een deelnemernummer contact op met de NVWA.</i>                          | <input checked="" type="checkbox"/> Ja > Vul uw deelnemernummer in | 10800  |
|     |   | <input type="checkbox"/> Nee > U kunt geen aanvraag doen           |  |
| 1.2 | Vul de gegevens in van de instellingsvergunninghouder die de projectvergunning aanvraagt.   | Naam instelling of organisatie                                     | Universiteit Utrecht   |
|     |   | Naam van de portefeuillehouder of diens gemachtigde                | [REDACTED]   |
|     |   | KvK-nummer   | 30275924   |
| 1.3 | Vul de gegevens van het postadres in.<br><i>Alle correspondentie van de CCD gaat naar de portefeuillehouder of diens gemachtigde en de verantwoordelijke onderzoeker.</i> | Straat en huisnummer   | Instantie voor Dierenwelzijn Utrecht   |
|     |   | Postbus  | 12007  |
|     |   | Postcode en plaats   | 3501AA Utrecht   |
|     |   | IBAN   | NL27INGB0000425267   |
|     |   | Tenaamstelling van het rekeningnummer                              | Universiteit Utrecht   |
| 1.4 | Vul de gegevens in van de verantwoordelijke onderzoeker.  | (Titel) Naam en voorletters  | [REDACTED] <input type="checkbox"/> Dhr. <input checked="" type="checkbox"/> Mw. |
|     |   | Functie  | [REDACTED]   |
|     |   | Afdeling   | [REDACTED]   |
|     |   | Telefoonnummer   | [REDACTED]   |
|     |   | E-mailadres  | [REDACTED]   |
| 1.5 | (Optioneel) Vul hier de gegevens in van de plaatsvervangende verantwoordelijke onderzoeker.   | (Titel) Naam en voorletters  | <input type="checkbox"/> Dhr. <input type="checkbox"/> Mw.                       |
|     |   | Functie  |  |
|     |   | Afdeling   |  |
|     |   | Telefoonnummer   |  |
|     |   | E-mailadres  |  |



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

## 2 Over uw aanvraag

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

## 3 Over uw project

- 3.1 Wat is de geplande start- en einddatum van het project?
- |            |              |
|------------|--------------|
| Startdatum | 1 - 5 - 2016 |
| Einddatum  | 1 - 5 - 2021 |
- 3.2 Wat is de titel van het project?
- |  |
|--|
| Nieuwe immuuntherapie voor chronische ontstekingen |
|--|
- 3.3 Wat is de titel van de niet-technische samenvatting?
- |  |
|--|
| Nieuwe therapie voor chronische ontstekingsziekten |
|--|
- 3.4 Wat is de naam van de Dierexperimentencommissie (DEC) aan wie de instellingsvergunninghouder doorgaans haar projecten ter toetsing voorlegt?
- |             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| Naam DEC    | DEC Utrecht                   |
| Postadres   | Postbus 85500 3508 GA Utrecht |
| E-mailadres | dec-utrecht@umcutrecht.nl     |

## 4 Betaalgegevens

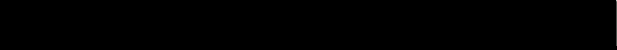
- 4.1 Om welk type aanvraag gaat het?  Nieuwe aanvraag Projectvergunning € 1441,- Lege  
 Wijziging € Lege
- 4.2 Op welke wijze wilt u dit bedrag aan de CCD voldoen.  
 Via een eenmalige incasso  
 Na ontvangst van de factuur
- Bij een eenmalige incasso geeft u toestemming aan de CCD om eenmalig het bij 4.1 genoemde bedrag af te schrijven van het bij 1.2 opgegeven rekeningnummer.*

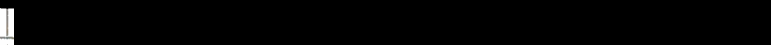
## 5 Checklist bijlagen

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

## 6 Ondertekening


- 6.1 Print het formulier uit, onderteken het en stuur het inclusief bijlagen via de beveiligde e-mailverbinding naar de CCD of per post naar:
- Centrale Commissie  
 Dierproeven  
 Postbus 20401  
 2500 EK Den Haag
- Ondertekening door de instellingsvergunninghouder of gemachtigde (zie 1.7). De ondergetekende verklaart:
- dat het projectvoorstel is afgestemd met de Instantie voor Dierenwelzijn.
  - dat de personen die verantwoordelijk zijn voor de opzet van het project en de dierproef, de personen die de dieren verzorgen en/of doden en de personen die de dierproeven verrichten voldoen aan de wettelijke eisen gesteld aan deskundigheid en bekwaamheid.
  - dat de dieren worden gehuisvest en verzorgd op een wijze die voldoet aan de eisen die zijn opgenomen in bijlage III van richtlijn 2010/63/EU, behalve in het voorkomende geval de in onderdeel F van de bijlage bij het bij de aanvraag gevoegde projectvoorstel gemotiveerde uitzonderingen.
  - dat door het ondertekenen van dit formulier de verplichting wordt aangegaan de leges te betalen voor de behandeling van de aanvraag.
  - dat het formulier volledig en naar waarheid is ingevuld.

Naam 

Functie 

Plaats *Utrecht*

Datum *14-03-2016*

Handtekening 

Handwritten text, possibly a signature or date, located in the lower-left quadrant of the page.



## 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.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

In de westerse wereld is er toename aan patiënten met **chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten** (zoals bijvoorbeeld reumatoïde artritis en dermatitis). Alleen reumatoïde artritis treft ongeveer 1% van

alle volwassenen. Het probleem in deze chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is de foutieve immuun regulatie in deze patiënten, die zorgt voor het ontwikkelen van een auto-immune ontsteking gericht tegen lichaamseigen antigenen. De huidige therapie in deze patiënten is gebaseerd op algehele aspecifieke immuun suppressie. Het levenslange gebruik van deze medicatie gaat gepaard met een toegenomen kans op infecties, tumoren en het ontwikkelen van therapie resistentie, en is helaas niet effectief in alle patiënten.

De ideale therapie in dergelijke chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is het herstellen van de immuun balans door het herstellen van tolerantie specifiek tegen de lichaamseigen antigenen. Helaas blijkt het induceren van tolerantie *tijdens* chronische ontstekingen lastig.

Regulerende T<sub>H</sub>17 cellen zijn cruciaal in de immuun balans. In veel chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is beschreven dat de regulerende T<sub>H</sub>17 cellen verminderd aanwezig zijn of verminderd functioneel zijn. Door het activeren of induceren van regulerende T<sub>H</sub>17 cellen gericht tegen het ziekte inducerend-antigeen kan de immuun balans hersteld worden<sup>1</sup>. T<sub>H</sub>17 cellen zijn hierbij van groot belang. DCs spelen een centrale rol in het immuunsysteem en zijn essentieel voor de inductie van een effectieve T<sub>H</sub>17 cel response tegen pathogenen maar ook voor het induceren van T<sub>H</sub>17 cellen in de periferie en hierdoor dragen ze bij aan het behoud van de immuun balans<sup>2</sup>.

Het exploiteren van T<sub>H</sub>17 cellen als target voor immuuntherapie kan op verschillende manieren. Ten eerste kan je T<sub>H</sub>17 cellen die zogeheten tolerogene eigenschappen hebben gebruiken als **celtherapie**. Initiële studies laten zien dat met behulp van deze T<sub>H</sub>17 cellen (T<sub>H</sub>17) ziekte kan worden voorkomen in diermodellen voor chronische ontstekingen<sup>3,4,5</sup>. Daarnaast heeft een initiële fase I trials in New Castle in de mens laten zien dat het geven van T<sub>H</sub>17 therapie in principe veilig is in arthritis patiënten. Zij hebben geen bijwerkingen gezien tijdens de trial maar de effectiviteit kon niet beoordeeld worden in deze trials (persoonlijke communicatie).

Het probleem is dat het onduidelijk is wat de effectiviteit van een dergelijke T<sub>H</sub>17 therapie tijdens chronische ontstekingen bepaald en aan welke criteria, op zowel moleculair als eiwit niveau, de T<sub>H</sub>17 moet voldoen om in een patiënt met een chronische (auto-immuun) ziekte effectief en veilig te zijn. Een tweede manier om T<sub>H</sub>17 cellen te gebruiken als mogelijk therapeutische route is door het ontwikkelen van een T<sub>H</sub>17 **vaccin**. Wat we hiermee bedoelen is een vaccinatie die zorgt dat er regulerende T<sub>H</sub>17 cellen geïnduceerd worden in vivo tegen het vaccin eiwit, bijvoorbeeld door de aanwezigheid van een tolerogeen adjuvans of het gericht vaccineren via tolerogene routes. Vele studies hebben laten zien dat profylactisch vaccineren via mucosale routes met zelf-antigenen ziekte inductie kan voorkomen. Het therapeutisch vaccineren tijdens ziekte is echter veel minder effectief. De hypothese is dat de in vivo aanwezige T<sub>H</sub>17 tijdens een chronische ontsteking veranderd zijn, maar ook hier zijn de exacte eigenschappen van de dendritische cellen onbekend.

Voor dat een effectieve immuuntherapie met behulp van T<sub>H</sub>17 s in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten ontwikkeld kan worden is het dus cruciaal dat de eigenschappen van T<sub>H</sub>17 goed in kaart worden gebracht en dat de effectiviteit van verschillende directe en indirecte therapieën vergeleken worden **tijdens** chronische ontsteking.

### 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?

1. Wat zijn de karakteristieken van en in vitro gekweekte T<sub>H</sub>17 die effectief regulerende T<sub>H</sub>17 cellen induceert tijdens chronische ontsteking.  
Het beantwoorden van deze vraag zal een grote stap voorwaarts opleveren voor het ontwikkelen van T<sub>H</sub>17 therapie. Voor het veilig en effectief ontwikkelen van T<sub>H</sub>17 therapie is het essentieel

om te weten welke factoren een [redacted] definiëren op eiwit niveau en moleculair niveau en op het niveau van cel-cel interactie. Momenteel is het niet bekend welke eigenschappen van de [redacted] cruciaal zijn om [redacted] te induceren tijdens chronische ontstekingen. Ook is onbekend welke factoren bepalen dat een [redacted] niet verandert van functie na inspuiten bij een chronische ontsteking. Dit laatste is natuurlijk cruciaal voor veilige therapie, want als een [redacted] kan veranderen kan de effectiviteit van de therapie verminderen of in het ergste geval zelfs de ziekte verergeren<sup>4</sup>. Andere vragen die beantwoord moeten worden voordat een effectieve [redacted] celtherapie in de mens kan worden toegepast tijdens ziekte, is wat de ideale omstandigheden zijn voor therapie zoals, route van toediening, frequentie van behandeling, dosis van behandeling, antigeen belading van de [redacted] en welk kweek protocol het meest effectief is.

2. Kunnen we tijdens chronische ontsteking een [redacted] vaccin inzetten om in vivo via [redacted] regulerende [redacted] cellen te induceren en zo de immuun balans te herstellen. In dit deel van het onderzoek zal gekeken worden of het mogelijk is een therapeutisch vaccin te ontwikkelen waarmee in vivo [redacted] getarget kunnen worden en aan welke voorwaarden een dergelijk vaccin moet voldoen. Dit zal gedaan worden op basis van het maken van verschillende combinaties eiwit adjuvans en/of verschillende routes van toediening van het therapeutisch vaccin. Daarnaast zal ook gekeken worden naar het [redacted] dat tijdens de vaccinatie bereikt wordt in vivo en welke [redacted] essentieel zijn voor een [redacted] vaccinatie.

#### Haalbaarheid:

In dit project willen we een aantal fundamentele vragen beantwoorden die nodig zijn voor het ontwikkelen van [redacted] therapie in de toekomst. Binnen de onderzoeksgroep hebben we al aangetoond met behulp van in vitro onderzoek dat een bepaald type in vitro gekweekte [redacted] ( [redacted] ), maar of deze cellen ook in vivo effectief zijn is onbekend.



*Figuur 1:* [redacted] zijn gekweekt vanuit beenmerg van muizen in aanwezigheid van [redacted] en [redacted]. Deze [redacted] hebben [redacted]. Deze [redacted] zorgen voor activatie van [redacted] cellen. Daarnaast bleken [redacted] cellen gestimuleerd met deze [redacted].

In het verleden hebben we meer onderzoek gedaan naar [redacted] therapie in artritis binnen onze onderzoeksgroep. Uit dit onderzoek is gebleken dat [redacted] artritis kunnen onderdrukken wanneer profylactisch toegediend, helaas bleken deze [redacted] niet in staat chronische (auto-immuun) ziekte te onderdrukken. In de literatuur zijn momenteel meerdere [redacted] kweek protocollen beschreven die mogelijk wel een chronische ontsteking kunnen onderdrukken en juist deze zouden we in detail willen bestuderen in dit project<sup>3,7</sup>. Door het vergelijken van verschillende [redacted] protocollen en analyseren van de effectiviteit van verschillende [redacted] subsets in het induceren van regulerende [redacted] cellen tijdens chronische ontsteking, zowel in vitro als in vivo, kunnen we in dit project duidelijk aantonen welke [redacted] kunnen induceren tijdens chronische ontsteking. Door het vergelijken van

de moleculaire en eiwit profielen van deze cellen kunnen we zeer gedetailleerd in kaart brengen aan welke eigenschappen een effectieve [REDACTED] moet voldoen. Deze kennis kan gebruikt worden om een biomarker te ontwikkelen voor het testen van [REDACTED] voor humane therapeutische toepassing. In humane geneeskunde is het belangrijk om, voordat de therapie wordt toegepast, te weten of de celtherapie effectief en veilig is iedere keer dat een individuele patiënt behandeld wordt.

Daarnaast is binnen de onderzoeksgroep de afgelopen jaren veel onderzoek gedaan naar het ontwikkelen van mogelijke [REDACTED] vaccinaties. [REDACTED] hierbij onder andere gekeken naar mucosale toediening van zelf eiwitten ter voorkoming van ziekte<sup>8</sup>, of specifiek gericht targeten van [REDACTED]<sup>9</sup>. Via beide routes werd het ontstaan van artritis verminderd door het induceren van [REDACTED]. Helaas bleken beide methoden minder effectief als therapie dan profylactisch. Wat de oorzaak is van deze verminderde effectiviteit willen we graag uitzoeken door de [REDACTED] goed in kaart te brengen.

Een laatste punt waar we binnen de onderzoeksgroep naar gekeken hebben is of er mogelijk [REDACTED] adjuvantia beschikbaar zijn. Eerste aanwijzingen naar het gebruik van PLGA (poly-lactic-co-glycolic acid) partikels wees uit dat deze gebruikt kunnen worden om tolerantie inducerende capaciteit van een vaccin te verhogen<sup>10</sup>, door het moduleren van [REDACTED]. [REDACTED] die behandeld werden met PLGA partikels brachten meer retinaldehyde dehydrogenase tot expressie, wat mogelijk een rol speelt in het induceren van regulerende [REDACTED] cellen<sup>11</sup>.

Deze [REDACTED] studies die aansluiten bij de huidige aanvraag geven aan dat binnen de [REDACTED] de ervaring aanwezig is die noodzakelijk is voor het succesvol uitvoeren van het project.

Naast het gebruik van technieken en vaardigheden die beschikbaar zijn binnen de onderzoeksgroep zullen we gebruik maken van uitgebreide samenwerkingen nationaal en internationaal. Binnen het onderzoek naar [REDACTED] therapie is er vanuit de EU een werkgroep opgericht die AFFACT heet. In deze werkgroep wordt 2 maal per jaar overlegd over het onderzoek naar [REDACTED] en de problemen en oplossingen die men heeft gevonden. Als actieve deelnemers aan deze werkgroep zijn we snel op de hoogte van de nieuwste ontwikkelingen en kunnen hier actief op inspringen.

Voor het ontwikkelen van een [REDACTED] model zoals verderop beschreven in [REDACTED] zullen we gebruik maken van de expertise van de groep uit Nijmegen die dit model heeft opgezet en daar eerst de techniek en het model leren voordat we dit zelf zullen toepassen.

---

### 3.3 Belang

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

Het wetenschappelijk belang van deze studie is dat momenteel niet bekend is aan welke parameters een [REDACTED] moet voldoen om veilig en effectieve therapie te effectueren tijdens een chronische ontsteking. Ook is momenteel niet bekend of het mogelijk is een [REDACTED] vaccin in te zetten als therapie tijdens chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten. Deze kennis is van groot belang om deze therapie in de toekomst mogelijk te maken. De ontwikkeling van een mogelijke biomarker die vooraf effectiviteit en veiligheid van de celtherapie kan voorspellen bij de individuele patiënt is van groot belang om deze vorm van therapie in de toekomst mogelijk te maken. Het maatschappelijk belang zit in het induceren van langdurige tolerantie in de groter wordende groep mensen met chronische (auto-immuun) ontsteking ziekten, zoals patiënten met reumatoïde artritis, dermatitis, diabetes, colitis of MS. De kennis vanuit deze studie kan bijdragen aan de toekomstige ontwikkeling van een langdurig herstel van de immuun balans in vele patiënten met chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten op de lange termijn.

---

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

Binnen de studie willen we kijken of we een therapie kunnen ontwikkelen die een chronisch (auto-immuun) ontstekingsmodel zoals artritis kan onderdrukken.

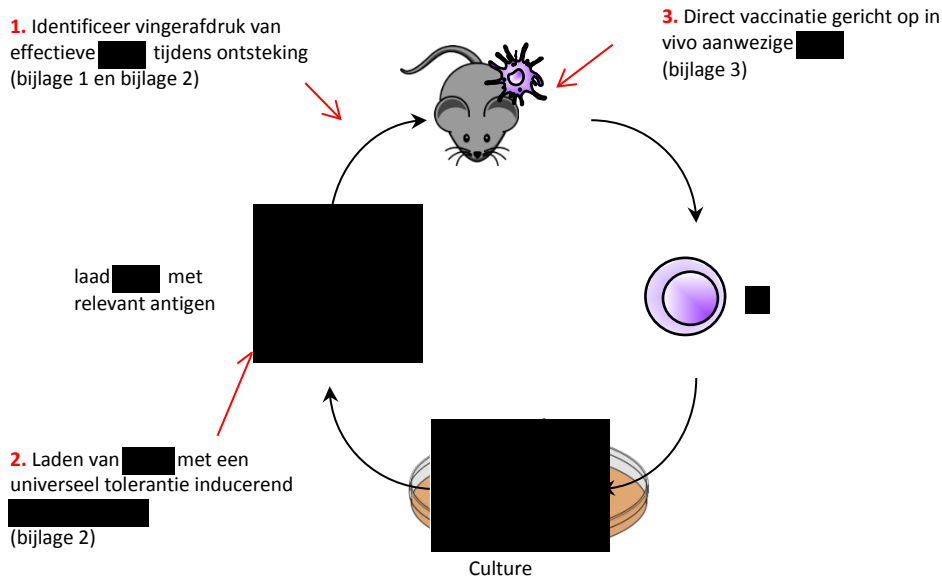
In het eerste deel (bijlage 1) van het onderzoek willen we verschillende in vitro kweek protocollen voor het kweken van mogelijke [REDACTED] met elkaar vergelijken. In de literatuur zijn verschillende [REDACTED] protocollen beschreven<sup>3,7</sup>. Het betreft vaak een gemengde cel populatie waarin ook [REDACTED] aanwezig zijn<sup>13</sup>. Hoewel het voor het onderzoek belangrijker is dat de cellen [REDACTED] zijn dan welk subtype [REDACTED] exact aanwezig is, zal dit wel meegenomen worden in de karakterisatie van de cellen. Door de protocollen met elkaar in vitro te vergelijken kunnen we de meest veelbelovende selecteren voor verder in vivo onderzoek. [REDACTED] zullen in vitro gekweekt worden en hun oppervlakte markers zullen gekarakteriseerd worden met behulp van flowcytometrie analyse. Tevens zullen we eiwit productie en [REDACTED] analyseren. Deze eiwitten [REDACTED] zijn van groot belang voor inter-cel communicatie en geven informatie over het functioneren van de [REDACTED]. Door het gebruik van qPCR, mRNA analyse en het gebruik van microarrays zullen we tevens de moleculaire vingerafdruk van deze cellen in kaart brengen. Juist deze laatste gedetailleerde analyse zal informatie geven welke unieke eigenschappen een [REDACTED] heeft. Naast het in kaart brengen van het fenotype van de gekweekte [REDACTED] willen we ook analyseren of de [REDACTED] in vitro regulerende [REDACTED] cellen kan induceren. Hiertoe zullen naïeve antigeen specifieke [REDACTED] cellen (geïsoleerd uit een [REDACTED] muis) gekweekt worden in aanwezigheid van [REDACTED] en antigeen. Na afloop zullen we de [REDACTED] cellen analyseren op expressie van markers die specifiek zijn voor [REDACTED] cellen, zoals [REDACTED] en hun [REDACTED] activiteit meten in een in vitro [REDACTED] assay.

In het verlengde (bijlage 2) hiervan willen we de twee typen [REDACTED] die in bijlage 1 getest zijn en daar effectief bleken om [REDACTED] cellen te induceren gebruiken, als celtherapie in vivo in chronische ontsteking. Door de [REDACTED] geladen met een [REDACTED] antigeen in te spuiten in diermodellen voor chronische ontstekingen zoals artritis, dermatitis en transplantatie, kan het ziekteverloop worden bestudeerd. Met behulp van [REDACTED] muizen kunnen we ook de [REDACTED] in vivo in detail volgen. Hiertoe worden [REDACTED] cellen geïsoleerd uit [REDACTED] muizen, gelabeld met een vitale fluorescente kleurstof en ingespoten in dieren met artritis. Deze cellen kunnen we aan het eind van de studie isoleren uit de immuun organen en bestuderen of ze [REDACTED] eigenschappen hebben gekregen.

In dit deel zullen we ook de effectiviteit van toIDCs geladen met het [REDACTED] inducerend [REDACTED] ([REDACTED]) vergelijken met [REDACTED] geladen met [REDACTED] eiwitten. Eerdere studies hebben laten zien dat [REDACTED] eiwitten verschillende chronische ontstekingen kunnen remmen en mogelijk als therapie ingezet zouden kunnen worden om [REDACTED] te induceren tegen chronische ontstekingen<sup>12</sup>. Om dit te bevestigen zullen we de met [REDACTED] inspuiten in andere modellen voor chronische ontsteking zoals dermatitis in de muis. Om een translationele stap te zetten naar de mens willen we ook gebruik maken van een [REDACTED] model voor transplantatie. In dit model worden [REDACTED] immuun cellen in een muis gespoten na een transplantatie en [REDACTED], de immuunreactie (afstotingsreactie) die hierdoor ontstaat is te onderdrukken met [REDACTED] cellen. Dit model is opgezet in Nijmegen<sup>15</sup> en zal ook in nauwe samenwerking worden uitgevoerd. Dit model zal uitwijzen of [REDACTED] eiwit ook humaan effectief zijn in een gecompliceerde in vivo immuunreactie, deze stap is cruciaal voor toekomstige toepassing in humane geneeskunde.

Het laatste deel van de studie (bijlage 3) zal zich meer richten op het induceren van [REDACTED] cellen door direct te vaccineren met een [REDACTED] vaccin. Hiervoor willen we verschillende adjuvantia<sup>14</sup> (bijvoorbeeld gemodificeerde [REDACTED] liganden, nanoparticles, nanoparticles met immuun [REDACTED] eiwitten<sup>12</sup> of [REDACTED]<sup>8</sup> in het geval van chronische ontstekingen of artritis specifiek) en dieren behandelen tijdens de ziekte. Het voordeel van deze aanpak is dat een directe vaccinatie therapie niet afhankelijk is van celkweek in gespecialiseerde ziekenhuizen en dus breder ingezet kan worden en



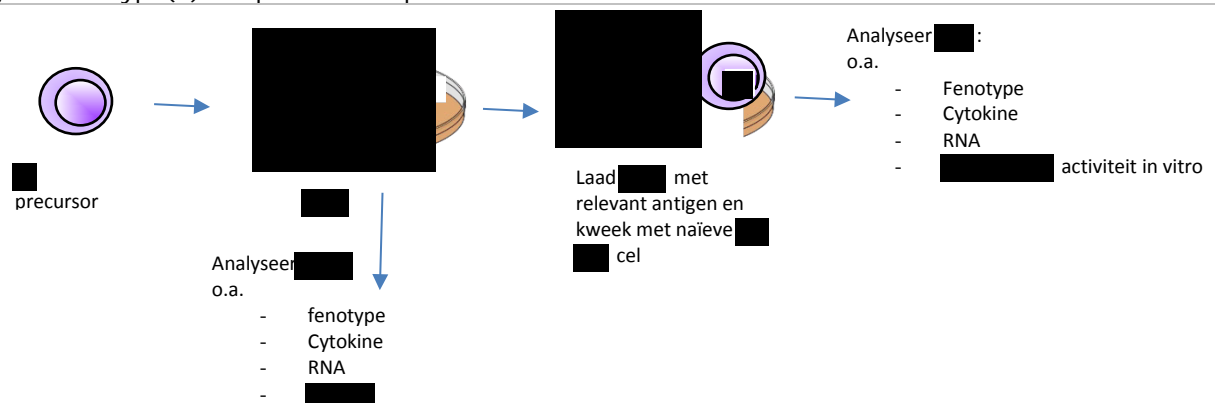


mogelijk meer patiënten kan bereiken. Met de kennis verkregen uit de andere twee delen kan gericht gekeken worden welke [redacted] cellen getarget moeten worden met een vaccin.

*Figuur 2:*

Schematische weergave van [redacted] kweek en therapie en de interactie tussen de verschillende bijlagen. [redacted] voorloper cellen worden geïsoleerd, in vitro gekweekt tot [redacted], geladen met antigenen. Na analyse in bijlage 1 worden de cellen ingespoten in muizen met een chronische ontsteking in bijlage 2. In bijlage 3 wordt de mogelijkheid van celvrije therapie onderzocht door direct [redacted] in vivo te bereiken met behulp van een [redacted] vaccin.

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



Deel 1: In dit deel zullen we beenmerg en andere lymfoïde organen uit naïeve muizen gebruiken als donor cellen voor het kweken van [redacted] in vitro. Het fenotype van de [redacted] zal beoordeeld worden met behulp van verschillende analyses zoals fluorescence activated cell sorting (FACS), microarray, luminex (voor eiwit en RNA productie), quantitative polymerase chain reaction (qPCR) en [redacted]. De in vitro functionaliteit zal beoordeeld worden met behulp van [redacted] cellen uit native donor muizen. Door [redacted] te laden met een antigen en [redacted] te stimuleren kan beoordeeld worden wat voor [redacted] cel reactie [redacted] in vitro induceren.

*Figuur 3:* schematische weergave van de kweek en de analyse van [redacted] in bijlage 1.

[redacted] precursors uit beenmerg worden gekweekt tot [redacted] in vitro, vervolgens worden deze direct geanalyseerd op uiterlijke kenmerken en vervolgens functioneel geanalyseerd door te kijken of ze

█ cells kunnen induceren. Dit wordt geanalyseerd door de █ cells te bestuderen op fenotype, cytokine productie en ook █ e capaciteit in een █ assay.

Deel 2: In het tweede deel zal bekeken worden of █ zoals gekweekt in het eerste deel, functioneel zijn in vivo tijdens chronische ontstekingsreacties. Hier worden maximaal twee kweekmethoden gekozen, op basis van de effectiviteit van de █ om in vitro █ cells te induceren. In eerst instantie zullen we dit in het proteoglycaan geïnduceerde artritis model testen. In dit model voor chronische artritis in de muis wordt een immuunreactie tegen het kraakbeen opgewekt door inspuiten van het kraakbeeneiwit proteoglycaan en met dit model hebben we veel ervaring binnen de vakgroep<sup>o.a. 6,8,9,12</sup>. Verder hebben we de beschikking over █ muizen met een specificiteit voor het ziekte inducerend proteoglycaan. █

█<sup>12</sup>. Hier zullen we verschillende routes van toediening (intradermaal, s.c., i.v. etc.), timing, frequenties (enkelvoudig of meervoudig) en de verschillende antigenen (bijvoorbeeld proteoglycaan en heat shock eiwit) met elkaar vergelijken en uitlezen op effectiviteit om de ontsteking te onderdrukken. Hierbij willen we ook het mechanisme van de therapeutische effectiviteit in kaart brengen met behulp van █ cel transfers naar de dieren met artritis en kijken of er inderdaad █ cells geïnduceerd worden en mogelijk de ziekte wordt geremd door deze cells. Door de verschillende transgene █ cells met congene markers te gebruiken en voor het transfereren te labelen met verschillende vitale fluorescente labels kunnen we deze in vivo vervolgen en aan het einde van het experiment in vitro verder analyseren. De protocollen die het meest effectief blijken willen we vervolgen ook testen in andere modellen voor chronische ontsteking zoals bijvoorbeeld humane transplantatie<sup>15</sup> en atopische dermatitis<sup>16</sup>. Voor het █ model is gekozen omdat dit een █ muis model is waarin de humane afweerreactie en █ inductie bestudeerd kan worden. Dit model zal in nauwe samenwerking met een onderzoeksgroep in █ worden uitgevoerd, omdat deze groep ervaring heeft met dit model. Het dermatitis model is gekozen omdat dit een chronisch ontstekingsmodel is waarmee ervaring is binnen de vakgroep en omdat dit model een ander type ontsteking geeft dan artritis. Artritis is een meer Th1 type ontsteking, terwijl dermatitis een meer gemengd Th2, Th1 beeld geeft. Door juist verschillende typen ontsteking te kiezen kunnen deze experimenten de vraag beantwoorden of █ therapie voor meerdere chronische ontstekingen gebruikt kan worden in de toekomst. In het geval van onderzoek bij dermatitis zal het █) vergeleken worden met █

Deel 3: In het laatste deel willen we een █ vaccin testen. Het is bekend dat via bepaalde routes █ in vivo getarget kunnen worden. Bijvoorbeeld via █ of █ vaccinatie routes. Het is echter moeilijk om tijdens chronische ontsteking deze █ te bereiken. Om dit te verbeteren willen we een vaccin combineren met een ziekte relevant antigen █ en een mogelijk █ adjuvans. De keuze voor de █ adjuvantia zal gemaakt worden op basis van literatuur en eerdere resultaten vanuit de onderzoeksgroep. Een voorbeeld is nanoparticles (█, deze induceren een █ fenotype in █<sup>10,11</sup>. Door █ partikel te combineren met █ peptide via een tolerogene route is het mogelijk een tolerogeen vaccin te maken. Naast PLGA willen we ook █ TLR liganden █ en andere nanopartikels al dan niet geladen met anti-inflammatoire hulpstoffen (denk hierbij aan antilichamen of siRNA tegen █) of nieuwe tolerogene adjuvantia testen. Ook in dit deel van de studie zullen we het mechanisme van het vaccin en de effectiviteit van regulerende █ inductie monitoren met behulp van de verschillende █ receptor transgene muismodellen. Tevens zal met behulp van verschillend conditionele knock-out muizen waarin specifieke subsets █ kunnen worden uitgeschakeld gekeken worden welke █ in vivo essentieel is voor het bereiken van een █ effect. Wanneer het █ effectief is als █ vaccin willen we dit herhalen in andere chronische ontstekingsmiddelen zoals, transplantatie en atopische dermatitis. Dit zijn ook modellen waar in de █ een belangrijke rol speelt tijdens de ontstekingen<sup>17</sup>.

Referentielijst DEC aanvraag [REDACTED]

Referenties:

1. Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 531-562
2. Ohnmacht, C., Pullner, A., King, S. B., Drexler, I., Meier, S., Brocker, T., & Voehringer, D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*, 206(3), 549-559.
3. Hilkens, C. M., Isaacs, J. D., & Thomson, A. W. (2010). Development of dendritic cell-based immunotherapy for autoimmunity. *International reviews of immunology*, 29(2), 156-183.
4. Hilkens, C. M. U., & Isaacs, J. D. (2013). Tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: where are we now?. *Clinical & Experimental Immunology*, 172(2), 148-157.
5. Stoop, J. N., Harry, R. A., von Delwig, A., Isaacs, J. D., Robinson, J. H., & Hilkens, C. M. (2010). Therapeutic effect of tolerogenic dendritic cells in established collagen-induced arthritis is associated with a reduction in Th17 responses. *Arthritis & Rheumatism*, 62(12), 3656-3665.
6. [REDACTED]
7. Manicassamy, S., & Pulendran, B. (2011). Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunological reviews*, 241(1), 206-227.
8. [REDACTED]
9. [REDACTED]
10. [REDACTED]
11. [REDACTED]
12. [REDACTED]
13. Helft, Julie, et al. "GM-CSF mouse bone marrow cultures comprise a heterogeneous population of CD11c+ MHCII+ macrophages and dendritic cells." *Immunity* 42.6 (2015): 1197-1211.
14. Keijzer, Chantal, et al. "Treg inducing adjuvants for therapeutic vaccination against chronic inflammatory diseases." *Frontiers in immunology* 4 (2013).
15. [REDACTED]
16. Spergel, Jonathan M., et al. "Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis." *Journal of Clinical Investigation* 103.8 (1999): 1103.
17. Van Eden, Willem, Ruurd Van der Zee, and Berent Prakken. "Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation." *Nature Reviews Immunology* 5.4 (2005): 318-330.
18. Glant, Tibor T., Alison Finnegan, and Katalin Mikecz. "Proteoglycan-induced arthritis: immune regulation, cellular mechanisms, and genetics." *Critical Reviews™ in Immunology* 23.3 (2003).
19. Hawkins, Penny, et al. "Applying refinement to the use of mice and rats in rheumatoid arthritis research." *Inflammopharmacology* 23.4 (2015): 131-150.
20. Hish Jr, Gerald A., et al. "Effects of Analgesic Use on Inflammation and Hematology in a Murine Model of Venous Thrombosis." *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* 53.5 (2014): 485.

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

Deel 1: De data uit deel 1 zullen gebruiken om de [REDACTED] kweek methoden voor deel 2 te optimaliseren.

Deel 2: slechts twee van de [REDACTED] protocollen die in deel 1 het meest effectief [REDACTED] cellen [REDACTED] zullen ook daadwerkelijk in vivo getest worden op therapeutische effectiviteit. De meest [REDACTED] zal vervolgens in deel 1 in nog meer detail bekeken worden met behulp van microarray analyse

Deel 3: De kennis van de eigenschappen van [REDACTED] uit 1 en 2 zal bijdragen aan mogelijkheid om in vivo [REDACTED] te karakteriseren, daarnaast zullen de kritische eigenschappen voor een [REDACTED] helpen in de zoektocht naar een effectief toleroegen vaccin.

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

| Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 1          | In vitro kweek van ██████████ en analyse van fenotype en functie                       |
| 2          | █████████ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten                      |
| 3          | Ontwikkelen van een ██████████ vaccin voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten |
| 4          |  |
| 5          |  |
| 6          |  |
| 7          |  |
| 8          |  |
| 9          |  |
| 10         |  |



## Format

### Niet-technische samenvatting

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

## 1 Algemene gegevens

|                              |   |
|------------------------------|---|
| 1.1 Titel van het project    | Nieuwe therapie voor chronische ontstekingsziekten            |
| 1.2 Looptijd van het project | 1-2-2016 t/m 1-2-2021   |
| 1.3 Trefwoorden (maximaal 5) | Chronische auto-immuunziekten, therapie, vaccin, cel therapie |

## 2 Categorie van het project

|  |   |
|--|---|
| 2.1 In welke categorie valt het project.     | <input checked="" type="checkbox"/> Fundamenteel onderzoek  |
|  | <input checked="" type="checkbox"/> Translationeel of toegepast onderzoek   |
|  | <input type="checkbox"/> Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie   |
| <i>U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.</i> | <input type="checkbox"/> Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de gezondheid                             |
|  | <input type="checkbox"/> Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort   |
|  | <input type="checkbox"/> Hoger onderwijs of opleiding   |
|  | <input type="checkbox"/> Forensisch onderzoek   |
|  | <input type="checkbox"/> Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven |

## 3 Projectbeschrijving

|   |   |
|---|---|
| 3.1 Beschrijf de doelstellingen van het project (bv de wetenschappelijke vraagstelling of het wetenschappelijk en/of maatschappelijke belang) | <p>Chronische ontstekingsziekten, zoals reuma, diabetes en colitis, zijn een zware belasting voor patiënten. Dit soort chronische ontstekingen zijn het gevolg van een fout in het immuunsysteem waardoor de balans verstoord is. Het immuunsysteem reageert dan op lichaamseigen eiwitten. De huidige medicatie is gericht op het geheel onderdrukken van het immuunsysteem. Langdurig gebruik gaat gepaard met bijwerkingen, zoals meer infecties en tumoren. Bovendien komt het voor dat de therapie na verloop van tijd minder goed of helemaal niet meer werkt. Beter zou zijn om de balans in het immuunsysteem te herstellen.</p> <p>Ons onderzoek is gericht op het vinden van een nieuwe therapie die de</p> |
|---|---|

immuunbalans kan herstellen bij patiënten met een chronische ziekte. Dit is helaas een steeds groter wordende groep patiënten in de westerse wereld, alleen al reumatoïde artritis treft ongeveer 1% van de gehele bevolking. Een therapie die de immuunbalans kan herstellen is dus van grote maatschappelijke waarde.

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

In het eerste deel van het onderzoek kijken we of het mogelijk is de balans in het immuunsysteem te herstellen via een zogeheten celtherapie. Hiervoor maken we in het laboratorium een bepaalde witte bloedcel na die belangrijk is voor het in stand houden van de immuunbalans bij gezonde mensen en dieren. Tijdens ziekte geven we de cel terug aan het zieke dier en kijken we of we daarmee de balans herstellen. Ook willen we een antwoord krijgen op de vraag aan welke voorwaarden een goede, effectieve en veilige celtherapie moet voldoen. Deze voorwaarden kunnen in de toekomst gebruikt worden om cellen te testen voordat ze in de patiënt gebruikt worden.

Het tweede deel van het onderzoek geeft antwoord op de vraag of het mogelijk is een vaccin te ontwikkelen voor chronische ontstekingsziekte. Het voordeel van een vaccin is dat we er geen cellen voor hoeven te kweken, waardoor we in de toekomst meer patiënten kunnen behandelen. Een nadeel is dat vaccins juist tijdens chronische ontstekingen moeilijk inzetbaar zijn, zo blijkt uit eerder onderzoek. In dit project zullen we de vraag onderzoeken waarom het zo moeilijk is een chronische ontsteking te doorbreken.

3.3 Welke diersoorten en geschatte aantallen zullen worden gebruikt?

In totaal zullen we voor de verschillende delen van het onderzoek maximaal 8569 muizen gebruiken.

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

De dieren waar we de nieuwe therapie op testen zullen een chronische ziekte ontwikkelen zoals bijvoorbeeld artritis. Het geven van injecties geeft kort ongemak. Daarna ontwikkelen de dieren ziekteverschijnselen. Het onderzoeken en behandelen brengt stress voor de muizen met zich mee.

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

Ongeveer 30% van de dieren zal zonder voorafgaande handelingen worden gedood en dat geldt als licht ongerief. De dieren met chronische ziekten zullen maximaal matig ongerief ervaren.

3.6 Wat is de bestemming van de dieren na afloop?

De dieren die celdonor zijn voor het onderzoek naar de celtherapie zullen zonder voorafgaande handelingen worden gedood zodat we de cellen van het immuunsysteem kunnen onderzoeken. Aan het eind van het onderzoek zullen alle andere dieren worden gedood om ze te kunnen onderzoeken.

## 4 Drie V's

4.1 **Vervanging**

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

Het onderzoek naar een complex orgaansysteem als het immuunsysteem is helaas niet mogelijk met behulp van celkweeksystemen alleen, of door middel van computermodellen, omdat we nog niet voldoende kennis bezitten over de ingewikkelde interactie tussen de cellen.

4.2 **Vermindering**

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

We maken gebruik van gedegen statische berekeningen vooraf en van ziektemodellen waarmee we veel ervaring hebben, zodat we minder dieren nodig hebben om betrouwbare resultaten te verkrijgen. We maken gebruik van de expertise van de onderzoekers binnen de afdeling en werken samen met andere groepen met ervaring. Dit zorgt voor betrouwbaardere resultaten en vermindering van experimenten die om technische redenen minder succesvol zijn.

Daarnaast zullen we voor de ontwikkeling van de celtherapie eerst in het laboratorium kijken welke cellen het meest veelbelovend lijken en daar slechts enkele van testen in muizen.

4.3 **Verfijning**

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

In dit onderzoek hebben we gekozen voor muizen. Hiermee hebben we veel ervaring en door het gebruik van verschillende soorten muizen kunnen we meer informatie uit het onderzoek halen dan met het gebruik van andere diersoorten.

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

Tijdens de chronische ziekte zal de huisvesting van de dieren worden aangepast. In het geval van artritis bijvoorbeeld door de bedding in de kooi te verhogen en voer en water laag aan te bieden om belasting van de pootjes zo klein mogelijk te maken. Tevens zullen dieren regelmatig worden gecontroleerd op mate van ziekte en dieren die te veel last hebben van de ziekte volgens vooraf opgestelde normen zullen uit het experiment worden gehaald.

## 5 In te vullen door de CCD

Publicatie datum

Beoordeling achteraf

Andere opmerkingen

---

---





## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

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

### 1 Algemene gegevens

|     |   |                      |  |
|-----|---|----------------------|--|
| 1.1 | Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.  | 10800                |  |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in.                              | Universiteit Utrecht |  |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.                                  | Volgnummer           | Type dierproef   |
|     | <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | 1                    | In vitro kweek van [REDACTED] en analyse van fenotype en functie |

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In auto-immuun ziekten valt het immuunsysteem cellen van het lichaam zelf aan. De belangrijkste reden voor dit probleem is dat de regulatie van het immuunsysteem niet goed meer werkt. Om deze regulatie weer op orde te krijgen kunnen [REDACTED] worden gebruikt. Deze [REDACTED] [REDACTED] cellen zijn in het lichaam van groot belang bij het herstellen van de regulatie en [REDACTED]. Eén van de mechanismen die de [REDACTED] kunnen gebruiken is het induceren van antigeen specifieke [REDACTED] cellen [REDACTED]). Op deze manier kunnen specifieke immuun responsen worden onderdrukt.

In het eerste deel zullen we verschillende in vitro kweek methoden om [REDACTED] te kweken met elkaar vergelijken. Hiertoe worden [REDACTED] precursors geïsoleerd uit naïeve muizen die worden gedood zonder voorafgaande handelingen en vervolgens worden de cellen gekweekt in vitro.

De effectiviteit van de [REDACTED] in vitro zal uitgelezen worden met behulp van FACS, PCR en luminex, waarbij expressie van oppervlakte markers, productie van cytokines of [REDACTED] en gebruik van verschillende transcriptie factoren wordt beoordeeld. Daarnaast zal ook worden bestudeerd hoe effectief de [REDACTED] zijn in het induceren van [REDACTED] cellen. Dit zal worden getest via een co-culture van de [REDACTED] met [REDACTED] cel receptor transgene [REDACTED] cellen welke een bekende specificiteit hebben, zoals weergegeven in figuur [REDACTED] van de projectaanvraag. [REDACTED] cellen met een transgene [REDACTED] cel receptor worden geïsoleerd uit naïeve muizen specifiek voor de [REDACTED] cel receptor die gedood worden zonder voorafgaande handelingen.

Daarnaast is er momenteel geen helder raamwerk bekend waaraan een veilige effectieve [REDACTED] moet voldoen, de zogeheten [REDACTED] vingerafdruk. Deze vingerafdruk zullen we in kaart brengen van de 2 meest effectieve kweek methoden, die het best [REDACTED] cellen induceren in vitro en tevens effectief zijn in vivo (getest in bijlage 2). Het in kaart brengen zal gebeuren door een uitgebreide analyse uit te

voeren met behulp van microarrays en RNA sequencing. Deze vraagstukken zullen beantwoord worden door middel van de experimenten zoals beschreven in deze bijlage.

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.

Alle dieren in dit deel van de projectaanvraag zullen zonder voorafgaande handelingen worden gedood en vervolgens zullen de lymfoïde organen gebruikt worden voor het isoleren van [REDACTED] voorloper cellen en [REDACTED] cellen.

Alle analyses zullen in vitro worden uitgevoerd.

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

Er is overwogen hoeveel dieren er nodig zijn om een aan te tonen effect te bewijzen (true difference of the means). De calculatie van de hoeveelheid dieren is gedaan met de software behandeld in de proefdiercursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). De parameters zijn per primaire uitkomst parameter voor de power analyse zijn toegelicht hieronder.

## B. De dieren

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

Voor deze experimenten zal als diersoort de muis (tussen 6-12 weken oud) gebruikt worden. In eerdere experimenten is gebleken dat het kweken van [REDACTED] van muizen van deze leeftijd het meest succesvol is en de hoogste opbrengst gegenereerd. Als donor muizen voor de [REDACTED] wordt gebruik gemaakt veel gebruikte muizen stammen zoals Balb/c, C57BL of F1 van beide stammen. Deze dieren worden aangekocht van erkende proefdierleveranciers. Deze stammen worden gebruikt omdat op deze manier de data vergelijkbaar zijn met data uit de literatuur en omdat deze stammen ook gevoelig zijn voor de ontstekingsmodellen beschreven in bijlage 2. Zo wordt het proteoglycaan arthritis model geïnduceerd in Balb/c en beide stammen zijn gevoelig voor dermatitis, maar met een hogere incidentie in C57BL model. De [REDACTED] receptor transgene muizen die hieronder besproken worden zijn afkomstig uit eigen fok. De muizen zijn transgeen voor een [REDACTED] cel receptor specifiek voor bijvoorbeeld proteoglycaan, [REDACTED] eiwit of ovalbumine, de [REDACTED] eiwitten voor de modellen die in bijlage 2 getest zullen worden.

Om [REDACTED] te kweken zijn [REDACTED] donoren nodig aangezien de [REDACTED] worden gekweekt.

In het project willen we maximaal 10 verschillende (reeds in de literatuur beschreven) [REDACTED] protocollen vergelijken<sup>3</sup>. Verschillende kweekmethoden geven verschillende type cellen, en van enkele in het verleden beschreven [REDACTED] kweekprotocollen is bekend dat deze profylactisch [REDACTED] zijn, maar niet functioneel [REDACTED] kunnen induceren tijdens ontsteking<sup>6</sup>. Juist dit laatste is cruciaal om effectief als [REDACTED] therapie ingezet te kunnen worden bij patiënten. Door meerdere protocollen en de verschillende cellen die tijdens de kweek ontstaan gedetailleerd te onderzoeken in vitro onder artificiële ontstekingscondities (toevoeging van o.a. ontstekingsmediatoren aan het kweekmedium) voor we deze in vivo testen willen we het aantal gebruikte dieren zoveel mogelijk beperken en alleen de meest veelbelovende cellen in vivo testen.

In het verleden is gebleken dat we voor het opzetten van een nieuwe kweek methode ongeveer 5 muizen nodig hebben als [REDACTED] donor ( $5 \times 10 = 50$  muizen). Dit aantal is gebaseerd op de vergelijking van verschillende kweekmedia om de meest optimale cel aantallen na afloop van de kweek te verkrijgen, juist het kweken in aanwezigheid van [REDACTED] condities zorgt voor verminderde celopbrengsten (persoonlijke observatie). Naast het optimaliseren van de kweek condities is ook aantal cellen dat na afloop van de kweek beschikbaar is belangrijk voor analyse van oppervlakte markers, deze oppervlakte markers (bijvoorbeeld [REDACTED]) geven inzicht of de kweek daadwerkelijk [REDACTED] cellen heeft voortgebracht<sup>13</sup>.

Om voldoende [REDACTED] te kweken voor de analyse van de oppervlakte markers met behulp van FACS, cytokine productie en RNA met qPCR of [REDACTED] hebben we 5 donor dieren nodig. Dit is op basis van cel opbrengsten zoals we die in het verleden bepaald hebben binnen onze vakgroep na het kweken van [REDACTED] in aanwezigheid van [REDACTED]. Het mogelijk is dat niet alle kweekmethoden een zelfde hoeveelheid cellen zullen opleveren maar dit is vooraf niet met zekerheid vast te stellen.

Door ervaring uit eerdere experimenten met dergelijke parameters als cytokine productie en qPCR resultaten gaan we uit van een variatie (sigma (standaarddeviatie) tweezijdig) in uitkomst tussen de experimentele groepen van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie.

Het aan te tonen effect (true difference of means, effect size) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Het betrouwbaarheidsinterval (alfa) wordt gesteld op 5% omdat we in deze experimenten voornamelijk geïnteresseerd zijn in het effect ten opzichte van de controle en niet tussen de groepen onderling. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 9 experimentele eenheden moeten gebruiken. ( $9 \times 5 \times 10 = 450$  muizen)

Maximaal 2 meest veelbelovende kweekprotocollen zullen vervolgens worden getest in vivo in deel 2. Voor het transfereren van [REDACTED] met verschillende doses en frequenties zoals beschreven in deel 2 zullen gemiddeld [REDACTED] per ontvanger muis worden door gespoten. Uit een donor muis kunnen we ongeveer [REDACTED] kweken dus dit komt neer op 10 ontvanger dieren per donor en voor de 1176 ontvanger dieren in deel 2 betekend dit dus **118** muizen in totaal.

Ook zal van deze 2 methoden een microarray of een RNAseq analyse worden uitgevoerd op de [REDACTED] om een gedetailleerd beeld te krijgen van de genen die specifiek zijn voor [REDACTED]. Om voldoende RNA te verkrijgen voor de microarray analyse van de meest effectieve [REDACTED] (en de benodigde positieve en negatieve controles) zijn [REDACTED] cellen nodig van minimaal 3 afzonderlijke kweken. Het aantal cellen is gebaseerd op de benodigde hoeveelheid RNA die uit de cellen geïsoleerd kan worden voor de analyse en de kwaliteitscontrole vooraf. De resultaten van drie afzonderlijke kweken worden vergeleken om de uniformiteit en reproduceerbaarheid van de resultaten te bevestigen. Zonder de analyse van 3 afzonderlijke kweken kunnen de resultaten het gevolg zijn van variatie tussen de kweken en niet specifiek voor de vingerafdruk van de [REDACTED].

Inclusief alle controles (met en zonder [REDACTED] protocol, met en zonder pro-inflammatoire cytokines, met en zonder maturatie en negatieve controle) zijn dit 7 condities. In totaal zijn hiervoor dus 6 dieren nodig per conditie dus **12** dieren in totaal.

Naast donoren voor het kweken van de [REDACTED] zijn ook donor dieren nodig om de effectiviteit van de [REDACTED] te analyseren op basis van [REDACTED]. Hiervoor zullen we [REDACTED] muizen gebruikt worden. Uit eerdere experimenten is gebleken dat uit 1 donor muis ongeveer [REDACTED] geïsoleerd kunnen worden. Om het effect van [REDACTED] cellen te onderzoeken zullen we [REDACTED] cellen samen kweken met verschillende [REDACTED] en vervolgens analyseren op oppervlakte markers, cytokines en expressie van transcriptie factoren. Op basis van eerdere experimenten weten we dat voor deze analyses ongeveer [REDACTED] cellen nodig zijn per conditie (= 3 donoren). Het aantal condities dat we willen testen zijn de 10 verschillende [REDACTED] kweek protocollen in aan- of afwezigheid van proinflammatoire cytokines (om ontsteking na te bootsen in vitro), in aanwezigheid van enkele [REDACTED] liganden (om verschillende infecties na te bootsen) en in aanwezigheid van [REDACTED] (een gemodificeerd [REDACTED] ligand) zoals dit ook bij humane [REDACTED] wordt gebruikt voordat de cellen ingespoten worden bij de patiënten<sup>(3,4)</sup>.

In totaal komt dit dus neer op 5 verschillende condities \* [REDACTED] protocollen \* [REDACTED] cel donoren = **150** [REDACTED] donor muizen.

Aantal dieren:

Opzet: 50

Analyse oppervlakte markers etc.:  $10 \times 5 \times 9 = 450$

[REDACTED] in vivo: 118

Microarray: 12 muizen

[REDACTED] donoren:  $5 \times 10 \times 3 = 150$

Totaal aan tal dieren:

WT: 630 muizen

Tg: 150 muizen

### 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.

Door alle verschillende [REDACTED] kweekmethoden uit te testen in vitro en te kijken of de [REDACTED] onder deze condities [REDACTED] cellen kunnen induceren kunnen we het aantal verschillende [REDACTED] dat we in vivo zullen testen in modellen voor chronische ontsteking verminderen.

Het gebruik van een [REDACTED] cellijn is niet mogelijk. [REDACTED] cellijnen zijn zogenaamde 'end-stage' cellen en de bekende cellijnen ([REDACTED]) zijn allen representatief voor proinflammatoire [REDACTED] zoals die in de milt van de muis gevonden niet representatief voor [REDACTED]

Voor de muis zijn bij ons geen antigeen specifieke [REDACTED] cellijnen bekend die kunnen differentiëren tot [REDACTED] cellen, omdat deze cellen niet naïef zijn. Het gebruik van [REDACTED] cel hybridoma's is ook niet wenselijk omdat we dan alleen [REDACTED] cel activatie kunnen analyseren en geen inductie van [REDACTED] cellen of effectiviteit van een [REDACTED] cel.

In deze dierproef kiezen we muizen stammen die relevant zijn in het verdere onderzoek als ook het gebruik van [REDACTED] muizen om in meer detail het effect op [REDACTED] cel differentiatie te kunnen bekijken. Vanwege de complexiteit van de immuunrespons is het niet mogelijk dit te vervangen door bijvoorbeeld computer modellen. In alle gevallen zal eerst gedegen literatuur onderzoek gedaan worden om de meest veelbelovende [REDACTED] protocollen te selecteren.

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

Alle dieren zullen zonder voorafgaande handelingen gedood worden volgens de geldende richtlijnen. De dieren zullen in groepen worden gehuisvest conform geldende normen van huisvesting en kooiverrijking.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting voorzien.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

n.v.t.

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

n.v.t.

### 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?

X 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 van alle dieren in dit deel worden geclassificeerd als licht. Alle dieren gebruikt in deze dierproef worden zonder handelingen gedood en bij fok van ██████ receptor transgene muizen die in deze bijlage beschreven zijn geen klinische verschijnselen bekend of beschreven.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Het doden van de dieren is noodzakelijk om donor cellen te verzamelen voor het uitvoeren van de experimenten zoals beschreven

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.  | 10800   |            |                |   |   |
|------------|---|---|------------|----------------|---|---|
| 1.2        | Vul de naam van de instelling of organisatie in.  | Universiteit Utrecht  |            |                |   |   |
| 1.3        | Vul het volgnummer en het type dierproef in.<br><br><i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | <table border="1"> <thead> <tr> <th>Volgnummer</th> <th>Type dierproef</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>2</td> <td>███ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten</td> </tr> </tbody> </table> | Volgnummer | Type dierproef | 2 | ███ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten |
| Volgnummer | Type dierproef  |   |            |                |   |   |
| 2          | ███ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten   |   |            |                |   |   |

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit deel van het project zal gekeken worden naar de effectiviteit van ███ als gekweekt onder deel 1 in het onderdrukken van een chronische ontsteking met de nadruk op het therapeutisch effectiviteit. In de literatuur zijn meerdere experimenten beschreven waarin gekeken is naar het effect van ███ therapie om chronisch ontstekingen voorkomen, maar nog weinig data is beschikbaar over het onderdrukken **tijdens** de ziekte. In dit deel zullen we kijken wat het ideale behandel protocol is van een chronisch ontsteking zoals artritis, met behulp van het proteoglycaan geïnduceerde artritis model<sup>0.a. 6, 8, 9, 11, 12</sup>. Dit is een chronisch model waarbij het ziekte verloop intermitterend en relatief mild verloopt, vergelijkbaar als bij de mens. We hebben gekozen voor dit chronische model om juist het effect tijdens chronische ontsteking van ███ therapie te onderzoeken. Daarnaast hebben ███ met dit relatief lichte model.

Tevens zullen we in dit model ook het mechanisme onderzoeken met behulp van ███ muizen specifiek voor het ziekte inducerend antigeen, ███. Door zowel de effector ███ cellen (die de ziekte veroorzaken) als naïeve ███ cellen te labelen met een zogeheten 'vital dye' kunnen we deze cellen terug vinden in het dieren en met behulp van o.a. FACS analyse bepalen hoe de cellen beïnvloed zijn door de tolDC therapie. Op deze manier kunnen we beoordelen of ███ ook in vivo ███ cellen ███ specifiek kunnen induceren.

Om ███ cellen te induceren zullen we gebruik maken van peptiden die ███ kunnen induceren. Hierbij zullen we een ███ peptide gebruiken, waarvan bekend is dat het ziekte geïnduceerd tegen ███ kan voorkomen<sup>8</sup>. Maar ook een eerder door ███ peptide het ███ peptide. Dit ███ peptide kan antigeen specifieke ███ celen induceren in het proteoglycaan geïnduceerde artritis muis model onafhankelijk van het ziekte inducerend antigeen<sup>12</sup>. De hypothese is dat dit ███ cellen induceert tegen verschillende

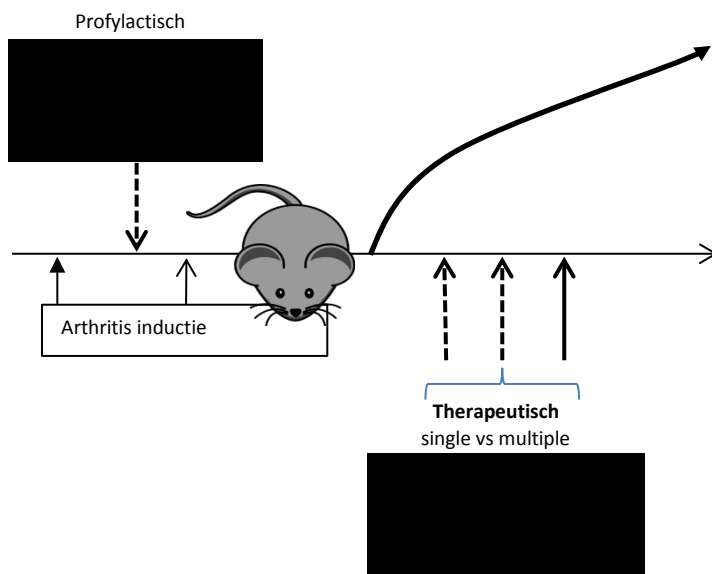
chronische ontstekingen. Initiële experimenten in transplantatie modellen in de muis laten inderdaad [ ] cel gemedieerde bescherming zien [ ] ).  
 Juist dit aspect van [ ] therapie in combinatie met een peptide dat [ ] cellen induceert in verschillende chronische ontstekingsziekten zou van grote meerwaarde zijn voor het ontwikkelen van [ ] therapie voor humane patiënten. Om te onderzoeken of de hypothese correct is willen we 1 type [ ] in 1 dosering die effectief is gebleken in het artritis model testen in andere ontstekingen modellen. Aangezien artritis een overwegend Th1 type ontsteking is hebben we gekozen om een chronisch (auto-immuun) ontstekingen model te nemen met een ander type ontsteking, het dermatitis model. Dermatitis een meer gemengde Th2 ontsteking, door juist duidelijk verschillende typen ontsteking te kiezen kunnen deze experimenten de vraag beantwoorden of [ ] therapie voor meerdere chronische ontstekingen gebruikt kan worden in de toekomst. Als derde model willen we de mogelijke translatie naar de humane patiënt beter in kaart brengen en hiervoor hebben we gekozen voor een zogeheten gehumaniseerd muis model. In dit wordt gebruik gemaakt van een [ ] muis waarin humane immuuncellen worden getransplanteerd om deze muis een humaan immuunsysteem te geven en vervolgens te kijken naar een transplantatie afstotingen. Ook in dit model is de ontsteking overwegend een Th1 type ontsteking. De [ ] therapie zal alleen in de laatste 2 genoemde modellen getest worden als blijkt dat deze effectief is in het onderdrukken van de ziekte in het artritis model.

In deel 2 zullen we de volgende vragen beantwoorden:

2a: Welke, dosis, frequentie, route, en timing van [ ] therapie is het meest efficiënt in het onderdrukken van chronisch ziekte. Als referentie zullen we een eenmalige profylactische (voor ziekte inductie) voor de toediening van [ ] nemen als vergelijking.

2b: Is [ ] therapie in staat om in vivo [ ] cellen te induceren en effector [ ] cellen te onderdrukken?

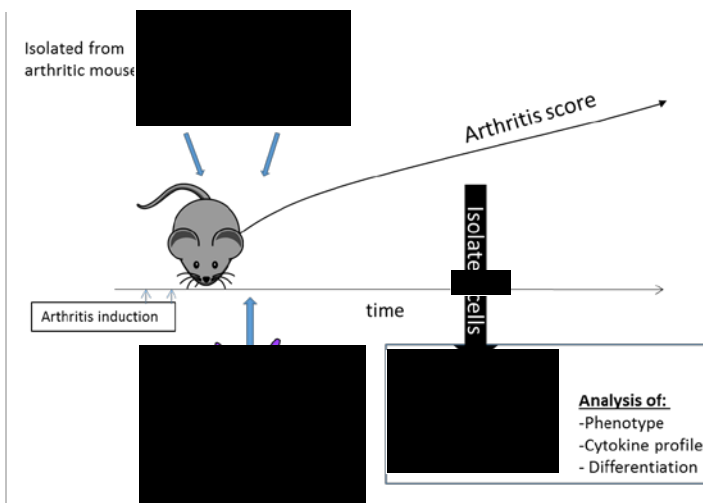
2c: werkt [ ] therapie ook in andere chronisch ontstekingsmodellen?



Figuur 1: [ ] worden op verschillende tijdstippen en in verschillende doses door gespoten.

Profylactisch zal slechts 1 dosis gekozen worden voordat de dieren ziekte ontwikkelen. Therapeutische toediening bij andere dieren zal starten zodra de eerste ziekte verschijnselen zichtbaar zijn, ongeveer een week na de 2<sup>e</sup> immunisatie. Vervolgens zal het effect op artritis verloop worden beoordeeld door de dieren meerdere keren per week te beoordelen op artritis verschijnselen.





Figuur 2: Arthritis wordt geïnduceerd door 2 injecties met humaan proteoglycaan in met adjuvans DDA. Vervolgens worden [redacted] cel receptor [redacted] cellen uit verschillende muizen gelabeld met verschillende "Vital Dyes" en door gespoten net als de [redacted]. Door proteoglycaan [redacted] cellen door te spuiten kan het effect op [redacted] cellen worden geanalyseerd en de [redacted] cellen geven een beeld van de [redacted] cellen.

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.

- Het arthritis model:
- Proteoglycaan geïnduceerde arthritis (PGIA) zal geïnduceerd worden met 2 injecties van proteoglycaan uit kraakbeen in DDA. Hiervoor zullen vrouwelijke dieren gebruikt worden op een balb/c achtergrond. Deze dieren hebben een hogere gevoeligheid voor het ontwikkelen van arthritis waardoor een hogere incidentie wordt gehaald, minder injecties en minder dieren nodig zijn <sup>18</sup>.
- De twee injecties worden i.p. toegediend met een tussen periode van 21 dagen. Vervolgens worden de dieren 2x per week bekeken op de ontwikkeling van arthritis verschijnselen (roodheid en zwelling van de pootjes). Indien de dieren arthritis krijgen wordt het klinisch onderzoek geïntensiveerd afhankelijk van de ernst van het verloop.
- Tijdens arthritis zal bloed afgenomen worden doormiddel van een wang prik, waarbij maximaal 100 ul er muis wordt afgenomen en maximaal 1 x per 3 weken.

Dieren die behandeld worden met [redacted] therapie zullen tussen de 1 en maximaal 5 injecties krijgen afhankelijk van welke experimentele groep de dieren zitten. Deze injecties met tussen de [redacted] (zoals bij de mens in de [redacted]) gegeven worden. Voor profylactische controle behandeling zullen dieren eenmalig ongeveer [redacted] krijgen vlak voor de 2<sup>e</sup> immunisatie voor arthritis inductie.

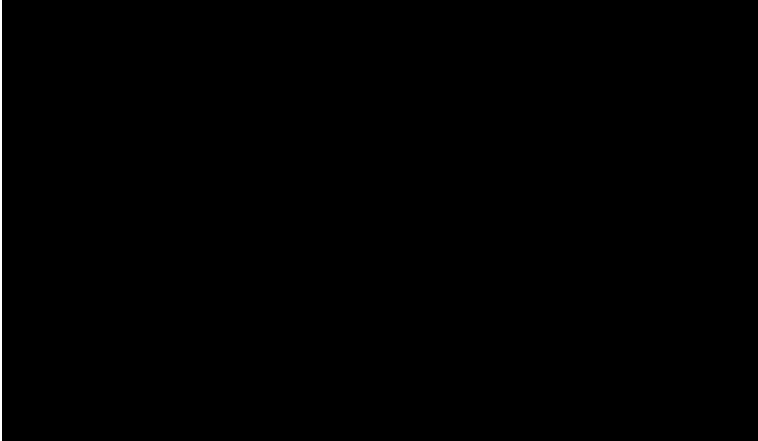
Dieren uit deel 2b waarbij het effect op [redacted] cellen wordt bekeken zullen een dag voor de [redacted] therapie [redacted] cellen gelabeld met een vital dye i.v. krijgen toegediend. In deze experimenten zullen alleen effectieve routes en een eenmalige toediening van [redacted] gebruikt worden.

In het laatste deel zal gekeken worden naar de effectiviteit van [redacted] therapie in andere modellen voor chronische ontsteking. Hierbij zal 1 dosis [redacted] gekozen worden die effectief was in arthritis (deel 2a) en met een zo laag mogelijk frequentie van doorspuiten. Ook in de andere modellen van chronische ontsteking zal het ziekte verloop op meerdere dagen per week worden vervolgd (minimaal 2x per week).

De andere modellen voor chronische ontsteking waar mee gewerkt zal worden zijn een [redacted] model en atopische dermatitis.

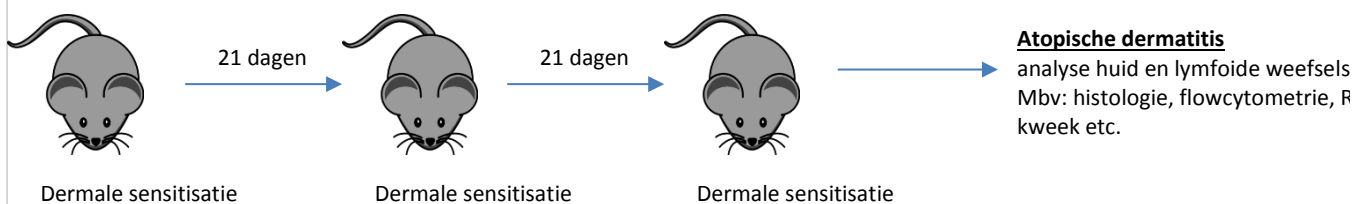
Het [redacted] model wordt uitgevoerd in samenwerking met de universiteit Nijmegen waar het

model ontwikkeld is. In dit model wordt op een immunodeficiënte muis onder narcose. Na 3 weken als de graft geaccepteerd is worden humane cellen doorgespoten en op dat moment zal ontsteking ontstaan in het transplantaat. Vervolgens zal de therapie worden ingezet door door te spuiten (in dit geval natuurlijk humane). Deze dieren worden vervolgens regelmatig (tot zelfs dagelijks) beoordeeld op afstoting van de huid. Na 3 weken zal de huid en de lymfoïde organen van de dieren geïsoleerd worden en beoordeeld op ontsteking, infiltraat en functionele differentiatie van de T cellen zoals te meten aan cytokine productie en transcriptie factor gebruik.



Figuur 3: Schematische weergave van het model. wordt onder narcose op een muis. Na 3 weken is de graft geaccepteerd en wordt een in de muis gebracht door het bloed cellen van een bloeddonor. Gedurende 3 weken wordt gekeken naar het ontwikkelen van ontsteking. Na 3 weken worden de en de lymfoïde organen geïsoleerd en de en immunrespons geanalyseerd met behulp van flowcytometrie en histologie.

Het tweede model is een dermatitis model, hiervoor is gekozen omdat het hier een gemengde Th2/Th1 gemedieerde response betreft en bij artritis of transplantatie met name een Th1/Th17 response en dit zal laten zien of therapie breed inzetbaar is bij een disbalans van het immuunsysteem. In dit model wordt de ziekte geïnduceerd met 2 tot 3 dermale sensitisaties met het allergeen in adjuvans met 3 weken tussen tijd. Na afloop wordt de huid geanalyseerd op infiltratie van ontstekingscellen en worden de lymfoïde organen geïsoleerd om de inductie van cellen te analyseren tegen het allergeen met o.a. kweek en flowcytometrie<sup>16</sup>. De therapie zal worden toegediend tussen de 2<sup>e</sup> en de 3<sup>e</sup>.



Figuur 4: schematische weergave van het dermatitis model. Muizen worden geschoren onder anesthesie en dermaal gesensitiseerd. Sensitisatie wordt 3 maal herhaald met tussenpozen van 3 weken en vervolgens worden huid en lymfoïde organen geïsoleerd voor analyse op ontwikkelen van cellen en huidontsteking.

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

Er is overwogen hoeveel dieren er nodig zijn om een aan te tonen effect te bewijzen (true difference of the means). De calculatie van de hoeveelheid dieren is gedaan met de software behandeld in de proefdiercursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). De aannames en vergelijkingen zijn onder B nader

toegelicht.

## B. De dieren

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

In dit deel van het project zal gebruik gemaakt worden van muizen afkomstig van commerciële proefdierleveranciers of vanuit eigen fok indien het specifieke transgene muizen betreft. In alle gevallen zullen volwassen dieren van beide sexen gebruikt worden waarbij in het algemeen dieren tussen de 6-12 weken aangekocht zullen worden, omdat in deze dieren het immuunsysteem volledig ontwikkeld is. Alleen in het geval van artritis inductie zal gekozen worden voor muizen van meer dan >16 weken oud en bij voorkeur gepensioneerde fokvrouwen, omdat deze de hoogste gevoeligheid hebben voor het ontwikkelen van artritis<sup>18</sup>.

### Aantallen deel 2a:

In dit deel willen we maximaal 3 verschillende doses, maximaal 3 verschillende frequenties (1x, 3x of 5x), meerdere routes (maximaal 3) testen als therapeutische mogelijkheden en dat vergelijken met een enkele profylactische dosis. Er is gekozen voor verschillende doses en verschillende frequentie om te kijken of hoger of herhaaldelijk doseren de effectiviteit kan verhogen. In de literatuur zijn meerdere routes beschreven voor het toedienen van celtherapie, het is echter nog niet bekend of het effect van celtherapie afhankelijk is van de route van toedienen.

Hierbij willen we 2 typen [redacted] die in bijlage 1 effectief [redacted] cellen induceerde in vitro testen op effectiviteit om in vivo [redacted] cellen te induceren en chronische ontsteking te onderdrukken.

Om de effectiviteit te bepalen worden [redacted] vergeleken met conventionele [redacted] in aan- en afwezigheid van het ziekte inducerend antigeen [redacted] of een anti-inflammatoir antigeen (zoals [redacted] eiwit). Om [redacted] te matureren en stabiliseren wordt in de literatuur gebruik gemaakt van een non-toxisch [redacted] ligand [redacted] ter controle zullen de [redacted] ook behandeld worden met dit humaan [redacted] ligand, hiermee beantwoorden we de vraag of dit inderdaad de effectiviteit en stabiliteit in vivo verhoogd..

Groepen:

1. conventionele [redacted] met antigeen
2. conventionele [redacted] zonder antigeen
3. [redacted] 1 met antigeen
4. [redacted] 2 met antigeen
5. [redacted] 1 met [redacted] en antigeen
6. [redacted] 2 [redacted] en antigeen

Per toedieningsroute zullen deze 6 testgroepen met elkaar vergeleken worden. In dit geval is groep 1 de referentie populatie die beschreven is als effectieve profylactische toediening van [redacted] conventionele [redacted] en groep 2 een negatieve controle.

In totaal zijn dit dus  $3 \times 3 \times 3 = 27$  therapie verschillende manieren van toedienen voor de 6 test groepen. In de analyse willen we groep 3 statistisch vergelijken met groep 1,2 en 5 en groep 4 met groep 1,2 en 6. Op deze manier analyseren we het effect van 2 [redacted] groepen afzonderlijk en niet direct met elkaar op deze manier zijn minder dieren nodig per analyse. De vergelijking tussen de groepen op basis van effectiviteit om [redacted] cellen te induceren zal in deel 2b bepaald worden.

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaarddeviatie (sigma, tweezijdig) in artritis score van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Omdat we 3 vergelijkingen willen maken hebben we een Bonferoni correctie toegepast op de alfa, waardoor we een alfa van 0.017 verkrijgen. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 11 dieren nodig hebben.

In totaal zou dat voor dit deel  $11 \times 6 \times 27 = 1782$  acceptor muizen

### Aantallen deel 2b:

In dit deel willen we de effectiviteit van de in bijlage 1 geselecteerde [redacted] beoordelen om in vivo

█ cellen te induceren tijdens ziekte.

Hier kiezen we voor een eenmalige toediening van de █ om de timing van █ cel activatie met zekerheid vast te kunnen stellen. Na transfer van █ cellen zullen maximaal 2 routes van █ worden geanalyseerd en zal de █ injectie op maximaal 3 verschillende tijdstippen gegeven worden. De keuze voor de routes zal gemaakt worden op basis van de resultaten uit deel 2a, hierbij zullen 2 effectieve routes geselecteerd worden. De verschillende tijdstippen zijn om te kijken of █ therapie meer █ cellen induceert wanneer deze vroeg in het ziekte verloop wordt gegeven ten opzichte van op latere tijdstippen. Het is de hypothese dat vroeg behandelen van patiënten net na ontwikkelen van de ziekte effectiever is dan later, deze hypothese kunnen we in dit experiment testen.

De derde vraag die we in dit deel willen beantwoorden is of een ziekte inducerend antigeen vergelijkbare █ cellen induceert als een █ antigeen zoals █ en we zullen deze direct met elkaar vergelijken.

Test groepen:

1. Conventionele █ met antigeen 1
2. Conventionele █ met antigeen 2
3. conventionele █ zonder antigeen (negatieve controle)
4. █ 1 met antigeen 1
5. █ 1 met antigeen 2
6. █ 2 met antigeen 1
7. █ met antigeen 2
8. █ met █ en antigeen
9. █ met █ en antigeen

In totaal hebben we hier dus 9 testgroepen, waarbij we 2 routes vergelijken en 3 tijdstippen van █ therapie. Voor het bepalen van de groepsgrootte gelden dezelfde aannames als in het vorige deel, met als verschil dat we in dit experiment meerdere vergelijkingen hebben. Hier willen we zowel de █ met elkaar vergelijken en betreft het 5 vergelijkingen, bijvoorbeeld groep 4 vergelijken we met groep 1,3,5,6 en 8. En groep 6 vergelijken we met groep 2,3,4,7 en 9.

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaarddeviatie (sigma, tweezijdig) in arthritis score van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Omdat we 5 vergelijkingen willen maken hebben we een Bonferoni correctie toegepast op de alfa, waardoor we een alfa van 0.01 verkrijgen. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 12 dieren nodig hebben.

Dit geeft dus  $12 \cdot 9 \cdot 2 \cdot 3 = 648$  acceptor dieren

Deze dieren ontvangen ook █ cellen naast de █ therapie. Hiervoor zullen we █ cel receptor █ muizen gebruikt worden. Uit eerdere experimenten is gebleken dat uit 1 donor muis ongeveer █ cellen geïsoleerd kunnen worden. Dus om █ cellen te kunnen doorspuiten hebben we 2 donor muizen nog. Dit geeft dus  $648 \cdot 2 = 1296$  donor dieren die gedood worden zonder voorafgaande handelingen.

Aantallen voor deel 2c:

In dit deel willen we aantonen dat █ therapie ook effectief is in andere chronische ontstekingen waar een ander type ontsteking aan ten grondslag ligt. In dit geval is gekozen voor een atopische dermatitis model omdat dit een meer Th2/Th1 type ontsteking is en arthritis een Th17/Th1 type.

Groepen:

1. Conventionele █ met antigeen
2. conventionele █ zonder antigeen
3. █ 1 met antigeen
4. █ 2 met antigeen
5. █ 1 met █ en antigeen
6. █ 2 █ en antigeen

In dit deel zullen we slechts 2 therapie schema's testen die effectief [redacted] induceren in het artritis model. In het dermatitis model gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) in ziekte score van minimaal 25%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Omdat we 3 vergelijkingen willen maken hebben we een Bonferoni correctie toegepast op de alfa, waardoor we een alfa van 0.017 verkrijgen. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 8 dieren nodig hebben.

In totaal betreft het dan  $8 \times 6 \times 2 = 96$  dieren

Om een translationele stap te kunnen maken is het essentieel om aan te tonen dat [redacted] therapie ook in het humane immuunsysteem in staat is [redacted] cellen te induceren. Hiertoe willen we gebruik maken van een muis transplantatie model, waarbij in immuundeficiënte muizen humane immuun cellen worden ingespoten samen met de [redacted] injectie.

Voor het humane transplantatie model is bekend dat de variatie rond de 20% ligt, de power wordt gesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen en het at te tonen verschil houden we op 50%. Bij een alfa van 0.017 door de bonferoni correctie, geeft dit een groeps grootte van 7 dieren per groep.

Groepen:

1. Conventionele [redacted] met antigeen
2. Geen celtherapie
3. [redacted] 1 met antigeen
4. [redacted] 2 met antigeen
5. [redacted] 1 met [redacted] en antigeen
6. [redacted] 2 [redacted] en antigeen

In deze proeven willen we de therapie van [redacted] met [redacted] vergelijken met [redacted] en een negatieve controle groep zonder therapie.

Omdat het hier experimenten betreft die afhankelijk zijn van humane donoren speelt ook donor variatie mee in de uitkomst van het experiment. Om eventuele donor variatie te kunnen beoordelen zal het experiment 3 maal uitgevoerd worden met 3 afzonderlijke donoren.

In totaal betreft het dan  $6 \times 7 \times 3 = 126$  muizen

In totaal voor deel 2:

Donor dieren: 1296

Artritis dieren:  $1782 + 594 = 2376$

Overige ontstekingsmodellen:  $96 + 127 = 223$

Totaal: **3895**

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

Indien surplus dieren beschikbaar zijn van de juiste leeftijd en achtergrond is hergebruik van dieren te overwegen. Het is echter van belang dat dieren niet eerder zijn gebruikt voor studies waarbij het immuunsysteem gemanipuleerd is omdat dit de uitkomst kan beïnvloeden

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 vraagstelling vereist de bestudering van de immuunrespons in vivo, namelijk kunnen [REDACTED] [REDACTED] Wat is de meest effectieve therapie voor wat betreft dosering, frequentie van toediening of de timing tijdens het ziekteverloop voor een [REDACTED] therapie? Vanwege de complexiteit van de immuunrespons is het niet mogelijk dit te vervangen door bijvoorbeeld computermodellen. Waar mogelijk worden wel eerst in vitro experimenten uitgevoerd voordat er wordt getest in muizen en met materiaal afkomstig uit deze dieren worden in vitro tests gedaan om zo de resultaten beter te kunnen interpreteren. Dit is gebaseerd op experimenten beschreven in de literatuur en ervaring binnen onze groep met diermodellen en de te analyseren parameters.

In het laatste deel wordt alleen gekeken naar het effect van op dat moment reeds bewezen therapeutisch toepassing van [REDACTED] in diermodellen voor chronische ontsteking waarmee ervaring is opgedaan door partners waarmee direct wordt samengewerkt of ervaring mee is binnen de eigen onderzoeksgroep.

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.

### Herhaling en duplicering

#### E. Herhaling

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

### Huisvesting en verzorging

#### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

#### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

### Ongeriefinschatting/humane eindpunten

#### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Artritis inductie en de ontwikkeling van ontsteking bij dermatitis en transplantatie geven ongerief bij de dieren. Echter het toepassen van pijnstillers bij deze dieren zal het immuunsysteem beïnvloeden<sup>19</sup>. Het is bekend dat NSAIDs de ontstekingsreactie direct beïnvloeden en daarmee het ziekte model nadelig beïnvloeden. Maar ook het gebruik van opioïden kan de immunoreactie beïnvloeden. Buprenorfine wordt vaak beschreven als een veilig alternatief met weinig effect op het immuunsysteem, echter ook buprenorfine kan de inductie van artritis nadelig beïnvloeden in sommige modellen, aangezien voor de modellen die gebruikt worden in deze aanvraag het effect van buprenorfine niet voldoende onderzocht is zal dit niet worden toegepast. Aangezien immunologische parameters bepalen zijn voor de uitkomsten van het onderzoek is het in deze dieren net mogelijk pijnstilling toe te passen.

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

In het geval van het transplantatie model zal het transplanteren van de huid onder algehele anaesthesie plaatsvinden met passende analgesie.

In het dermatitis model zullen de dieren onder gas anesthesie worden geschoren en gesensitiseerd.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Het ontwikkelen van dermatitis en transplantatie reactie zal aanleiding zijn voor het ontwikkelen van ongerief. Het ontwikkelen van anafylactische reacties in het dermatitis model zijn niet beschreven.
2. Handeling van de dieren meerdere malen per week ten behoeven van artritis score.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Ontsteking van de huid geeft irritatie en mogelijk jeuk.
2. Handeling geeft stress, echter het mogelijk ongerief van de artritis maakt vaker hanteren van de dieren noodzakelijk

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.

Voor de artritis score geldt een maximum score van 16 per dier. Ieder poot kan een score van 4 punten halen. Score 1 matige roodheid en zwelling aan 1 teen of de poot. Score 2 roodheid en zwelling aan de poot of aan maximaal 2 tenen. Score 3: roodheid en zwelling aan de poot en maximaal 3 tenen of milde zwelling van de poot en maximaal 4 tenen. Score 4: roodheid en zwelling aan zowel de poot als 4 tenen. Een score van 12 wordt beschouwd als een humaan eindpunt.

Voor het transplantatie model wordt als huumaan eindpunt necrose ten gevolge van afstoting van het transplantaat aangehouden.

Voor het dermatitis model wordt gekeken naar het ontwikkelen van dermatitis, duidelijke jeuk (continue krabben) en het openkrabben van de huid worden aangehouden als humaan eindpunt. Het dermatitis model is een progressief model en bij het ontwikkelen van jeuk zal deze niet verdwijnen, om de ontwikkeling van mogelijke secundaire infecties ten gevolge van krablaesies aan de huid te voorkomen beschouwen we de ontwikkeling van chronische jeuk als HEP.

Naast model specifieke humane eindpunten wordt ook gekeken naar algemeen welbevinden van de dieren, op basis duidelijke veranderingen in uiterlijk, gewicht of gedrag zullen de dieren worden geëuthanaseerd. Hierbij wordt gelet op bol zitten, roodheid rond de ogen en lusteloosheid voor een periode van > 24 uur

wordt beschouwd als humaan eindpunt. In het geval van een indicatie van gewichtsverlies worden de dieren gewogen en bij >15% gewichtsverlies in 2 dagen is het HEP bereikt.

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

In het geval van artritis en transplantatie is het te verwachten aantal dieren dat het HEP bereikt ongeveer 10%

In het geval van dermatitis is het ontwikkelen van de ziekte gelijk aan het bereiken van het HEP in dit geval zal tussen de 25 en maximaal 70% van de dieren het HEP bereiken (afhankelijk van de effectiviteit van de therapie).

Voor donor dieren is niet te verwachten dat het HEP bereikt wordt.

#### 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.

Donor dieren : licht ongerief

Het ongerief van de experimentele dieren is afhankelijk van de effectiviteit van de therapie. Voor de inschatting gaan we ervan uit dat slechts de helft van de therapie effectief zal zijn om zo het ongerief niet te onderschatten.

Artritis model: 25% licht, 75% van de dieren zullen tot maximaal matig ongerief hebben

Dermatitis model: 56% licht ongerief en in maximaal 44% van de dieren tot matig ongerief

Transplantatie model: 40% licht ongerief en 60% tot matig ongerief

### Einde experiment

#### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Na afloop van het experiment worden de immuun relevante organen geïsoleerd uit de dieren voor verder analyses.

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.  | 10800                |  |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in.                              | Universiteit Utrecht |  |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.                                  | Volgnummer           | Type dierproef   |
|     | <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | 3                    | Ontwikkelen van een [REDACTED] vaccin voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten |

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit deel van het project zal gekeken worden naar de effectiviteit van een therapeutisch vaccin bij chronische ziekten. In dit deel zullen de initiële experimenten ook weer gedaan worden in het proteoglycaan geïnduceerde arthritis model waarmee veel ervaring is (een typisch Th17/Th1 model) en zal in het vervolg ook gekeken worden naar de effectiviteit van een dergelijk [REDACTED] vaccin in een model voor dermatitis (een typisch Th2/Th1 model).

Om [REDACTED] cellen te induceren zijn verschillende methoden beschreven in de literatuur. Zo is het mucosaal immuunsysteem bekend om zijn [REDACTED] inducerende capaciteit in een profylactische setting. Recent zijn er meerdere aanwijzingen in de literatuur beschreven dat ook dermale toediening een goede route is om [REDACTED] cellen te krijgen. In dit deel van het project willen we ons voornamelijk richten op of we via de meest veelbelovende routes ([REDACTED]) [REDACTED] cellen kunnen induceren tijdens de aanwezigheid van een ontsteking, zoals bijvoorbeeld arthritis of dermatitis.

Door gebruik te maken van een [REDACTED] cel transfer model kunnen we het effect van de vaccinatie op [REDACTED] cel differentiatie in detail volgen. Daarnaast zullen we gebruik maken van een eerder [REDACTED] geïdentificeerd peptide: het [REDACTED] peptide. Dit peptide kan [REDACTED] celen induceren in het [REDACTED] geïnduceerde arthritis muis model [REDACTED] en mogelijk ook in andere ontstekingsziekten.

In deel 3 zullen we de volgende vragen beantwoorden:

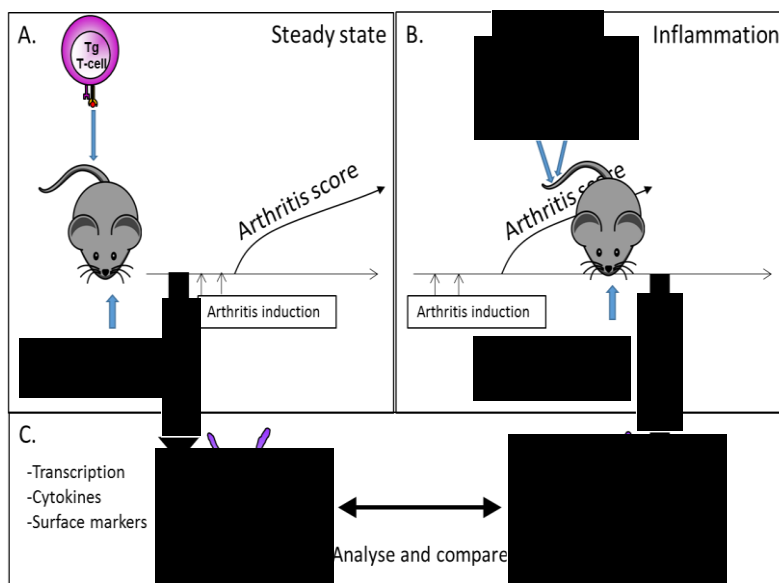
3a: is het mogelijk een chronische ontsteking te onderdrukken met een therapeutisch peptide vaccin met een tolerogeen adjuvans. Om deze vraag te beantwoorden zullen we verschillende adjuvantia testen. In ieder geval zullen we verschillende [REDACTED] onderzoeken omdat we eerder hebben aangetoond dat bijvoorbeeld PLGA nano-partikles tolerogene markers opreguleren in vitro in [REDACTED]. Maar ook [REDACTED] liganden en gemodificeerde [REDACTED] liganden worden in de literatuur aangewezen als potentiële [REDACTED]

adjuvantia

Om het effect van de vaccinatie in vivo te beoordelen zullen we hierbij gebruik maken van adoptieve transfer modellen waarin we T-cellen gelabeld met een vita dye doorspuiten en aan het eind van het experiment hun differentiatie en lokalisatie de muis kunnen beoordelen met behulp van FACS analyse.

De dieren zullen voor het ontwikkelen van ziekte gevaccineerd worden om de steady state vaccinatie te beoordelen en na induceren van de ziekte ( na de laatste immunisatie) om de therapeutische effectiviteit vast te stellen.

3b. De andere belangrijke vraag die wil in dit deel van het project willen beantwoorden is wat is er anders is aan de in vivo tijdens steady state en chronische ontsteking. In veel modellen is het goed mogelijk een profylactisch vaccinatie toe te passen door bijvoorbeeld gebruik te maken van inductie. Echter tijdens ontsteking is dit veel minder effectief. Om deze verschillen in kaart te brengen willen we kijken welke een rol spelen tijdens inductie door een vaccinatie te geven in conditionele knock-out muizen waarin we specifieke subset kunnen uitschakelen met behulp van ( ). Daarnaast zullen we isoleren na vaccinatie uit de drainerende lymfeknoten en deze vergelijken tussen dieren met een chronische ziekte en dieren zonder een chronische ontstekingsziekte.



Figuur 1:

Therapeutische en profylactische vaccinatie wordt vergeleken met de focus op en vaccinatie routes. Hierbij wordt het type dat betrokken is bij de inductie in kaart gebracht met behulp van specifiek transgene muizen, maar ook door te isoleren uit de drainerende lymfeklieren.

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.

- **Het arthritis model:**
- Proteoglycaan geïnduceerde arthritis (PGIA) zal geïnduceerd worden met 2 injecties van proteoglycaan uit kraakbeen in DDA. Hiervoor zullen vrouwelijke dieren gebruikt worden op een balb/c achtergrond. Deze dieren hebben een hogere gevoeligheid voor het ontwikkelen van arthritis waardoor een hogere incidentie wordt gehaald, minder injecties en minder dieren nodig zijn<sup>18</sup>.
- De twee injecties worden i.p. toegediend met een tussen periode van 21 dagen. Vervolgens worden de dieren 2x per week bekeken op de ontwikkeling van arthritis verschijnselen (roodheid en zwelling van de pootjes). Indien de dieren arthritis krijgen wordt het klinisch onderzoek geïntensiveerd afhankelijk van de ernst van het verloop.
- Tijdens arthritis zal bloed afgenomen worden doormiddel van een wang prik, waarbij maximaal 100 ul

- er muis wordt afgenomen en maximaal 1 x per 3 weken.
- Dieren waarbij het [REDACTED] wordt bekeken zullen een minimaal dag voor toediening van het vaccin [REDACTED] cellen gelabeld met een vital dye i.v. krijgen toegediend.
  - [REDACTED] vaccinatie ([REDACTED]) met ziekte inducerend antigeen ([REDACTED]) of [REDACTED] eiwit in aanwezigheid van een [REDACTED] adjuvant zal voor of na de 2<sup>e</sup> vaccinatie plaatsvinden om het onderscheid te maken tussen [REDACTED] vaccinatie in de steady state en tijdens ontsteking.
  - Het tweede model is een **dermatitis model**, hiervoor is gekozen omdat het hier een voornamelijk Th2 gemedieerde response betreft anders dan bij artritis dit zal laten zien of [REDACTED] vaccinatie breed inzetbaar is bij een disbalans van het immuunsysteem. In dit model wordt de ziekte geïnduceerd met 2 of 3 sensitatie met allergeen met 3 weken tussen tijd gevolgd door een challenge op de huid. De sensitatie wordt [REDACTED] afhankelijk van het antigeen ([REDACTED]). Vervolgens worden de dieren gechallengeerd en wordt de ontwikkeling van huidontsteking op de plek van de challenge visueel beoordeeld. Alle dieren zullen aan het eind van het experiment gedood worden om de immuun relevante organen te isoleren voor verdere analyse in het laboratorium.
  - [REDACTED] vaccinatie (mucosaal of dermaal) met ziekte inducerend antigeen (ovalbumine of huisstofmijt) of [REDACTED] eiwit in aanwezigheid van een [REDACTED] adjuvant zal voor of na de 2<sup>e</sup>/3<sup>e</sup> vaccinatie plaatsvinden om het onderscheid te maken tussen [REDACTED] vaccinatie in de steady state en tijdens ontsteking.

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

Er is overwogen hoeveel dieren er nodig zijn om een aan te tonen effect te bewijzen (true difference of the means). De calculatie van de hoeveelheid dieren is gedaan met de software behandeld in de proefdiercursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). De exacte afwegingen en statistische berekeningen zijn hieronder verder uitgewerkt.

## B. De dieren

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

In dit deel van het project zal gebruik gemaakt worden van muizen afkomstig van commerciële proefdier leveranciers of vanuit eigen fok indien het specifieke transgene muizen betreft. In alle gevallen zullen volwassen dieren gebruikt worden waarbij in het algemeen dieren tussen de 6-12 weken aangekocht zullen worden, omdat in deze dieren het immuunsysteem volledig ontwikkeld is. Alleen in het geval van artritis inductie zal gekozen worden voor muizen van meer dan >16 weken oud en bij voorkeur gepensioneerde fokvrouwen, omdat deze de hoogste gevoeligheid hebben voor het ontwikkelen van artritis. In het geval van dermatitis is er geen geslachtsvoorkeur voor de dieren.

### Aantallen deel 2a:

In totaal kunnen naar verwachting maximaal 10 verschillende adjuvantia testen. Enkele voorbeelden zijn [REDACTED] (mogelijk geladen met een [REDACTED]), anti-inflammatoire compounds als [REDACTED] of [REDACTED] liposomale formuleringen, anti-lichaam gemedieerde targeting van [REDACTED]<sup>4</sup>.

Hierbij willen we gebruik maken van 2 peptiden. Ten eerste het [REDACTED] waarvan [REDACTED] aangetoond dat het [REDACTED] in artritis en een tweede ziekte relevant peptide (bijvoorbeeld proteoglycaan peptide in artritis of ovalbumine in dermatitis).

Om de effectiviteit van het vaccin te testen zullen we maximaal 3 verschillende doseringen testen per verschillend adjuvans. Het aantal doseringen is afhankelijk van de formulering van het vaccin en de concentratie peptide die hierin beschikbaar is voor het immuunsysteem en meetbare [REDACTED] cel activatie geeft van de ingespoten [REDACTED].

Per experiment hebben we een positieve controle nodig met een bekend immuunsuppressieve stof (bijvoorbeeld dexamethason) en een onbehandelde negatieve controle en kunnen we in totaal 5 testgroepen analyseren (met 2 controles erbij zijn dat 7 groepen per experiment).

#### Groepen:

- Groep 1: positieve controle
- Groep 2; negatieve controle
- Groep 3: test vaccin 1 dosis 1
- Groep 4: test vaccin 1 dosis 2
- Groep 5: test vaccin 1 dosis 3

#### **Artritis model:**

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) van artritis hebben tussen de experimentele groepen van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. We vergelijken alle behandelingen met de negatieve controle en hebben dus 4 vergelijkingen. Door het toepassen van de Bonferoni correctie op de alfa, hebben we een alfa van 0.0125. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 12 dieren nodig hebben.

In totaal dus 10 vaccins \* 5 groepen\* 12 dieren= **600** muizen).

Omdat we in deze dieren ook de █ cel response willen vervolgd hebben maximaal **1200** donor muizen nodig, aangezien we 2 donor muizen nodig hebben om voldoende █cellen uit te isoleren voor een transfer (zie bijlage 2).

#### **Dermatitis model:**

Voor het dermatitis model gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) van artritis hebben tussen de experimentele groepen van minimaal 25%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. We vergelijken alle behandelingen met de negatieve controle en hebben dus 4 vergelijkingen. Door het toepassen van de Bonferoni correctie op de alfa, hebben we een alfa van 0.0125. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 12 dieren nodig hebben.

In totaal dus 10 vaccins \* 5 groepen\* 9 dieren= **450** muizen).

Omdat we in deze dieren ook de █ cel response willen vervolgd hebben maximaal **900** donor muizen nodig, aangezien we 2 donor muizen nodig hebben om voldoende █cellen uit te isoleren voor een transfer (zie bijlage 2).

#### Aantallen deel 3b:

In deel 3b zullen we ons richten op de █ die nodig is voor de inductie van de █ cel. In dit deel zullen we █ isoleren uit dieren die een chronische ontsteking en controle dieren kort na vaccinatie om de verschillen tussen deze █ in kaart te brengen. In deze vraagstelling is het niet noodzakelijk om verschillende diermodellen met verschillende ontstekingen te testen en beperken we ons tot het artritis model.

Hier willen we 2 effectieve vaccins testen (getest in 3a) via beide routes (█). Hierbij zullen de lymfeknopen geïsoleerd worden op 3 tijdstippen na vaccinatie om te analyseren of de █ veranderen over tijd na vaccinatie.

#### Groepen per experiment:

- Groep 1: positieve controle
- Groep 2: negatieve controle
- Groep 3: vaccin1 █
- Groep 4: vaccin 1 █

#### **Artritis model:**

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) van artritis hebben tussen de experimentele groepen van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference

of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. We vergelijken alle behandelingen met de negatieve controle en hebben dus 3 vergelijkingen. Door het toepassen van de Bonferoni correctie op de alfa, hebben we een alfa van 0.017. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 11 dieren nodig hebben.

- Dit zijn dus **44** dieren per experiment.
- Per vaccin wordt dit experiment **6** maal uitgevoerd, namelijk de dieren worden op 3 tijdstippen na vaccinatie geanalyseerd en zowel tijdens steady state als tijdens een ontsteking.
- We willen 2 succesvolle (in 3a) vaccinaties testen

In totaal dus 2 vaccins \* 6 experimenten \* 44 dieren = **528** muizen).

En tevens zullen we 2 effectieve vaccin routes ( ) en 2 effectieve formuleringen (bewezen in 3a) testen, samen met de juiste positieve (immunosuppressivum) als negatieve (ongevaccineerde) controle in zowel conventionele als conditionele knock-out muizen (2 stammen). In totaal zijn dit dus 6 groepen per stam dus 18 groepen van 12 dieren in totaal **216** dieren

In totaal voor deel 2:

Donor dieren: 2100

Artritis/dermatitis met vaccinatie: 600+450+528+216=1794

Totaal: **3894**

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

Indien surplus dieren beschikbaar zijn van de juiste leeftijd en achtergrond is hergebruik van dieren te overwegen. Het is echter van belang dat dieren niet eerder zijn gebruikt voor studies waarbij het immuunsysteem gemanipuleerd is omdat dit de uitskomst kan beïnvloeden

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 vraagstelling vereist de bestudering van de immuunrespons in vivo, namelijk kunnen ( ) Kunnen deze ( )? Via welke route is het mogelijk therapeutisch te vaccineren voor ( ) Vanwege de complexiteit van de immuunrespons is het niet mogelijk dit te vervangen door bijvoorbeeld computer modellen. Waar mogelijk worden wel eerst in vitro experimenten uitgevoerd voordat er wordt getest in muizen en met materiaal afkomstig uit deze dieren worden in vitro tests gedaan om zo de resultaten beter te kunnen interpreteren. Dit is gebaseerd op experimenten beschreven in de literatuur en ervaring binnen onze groep met diermodellen en de te analyseren parameters.

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 muizen waarbij artritis geïnduceerd is wordt er extra op gelet dat deze muizen extra voer in de kooi hebben liggen zodat ze niet per se op hun achterpoten hoeven staan om erbij te kunnen. Verder worden de muizen regelmatig gecheckt zodat het ongerief tot het minimum beperkt blijft. Bij de andere muizen is de standaard kooiverrijking aanwezig.

---

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

---

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

---

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Artritis inductie en de ontwikkeling van ontsteking bij dermatitis en transplantatie geven ongerief bij de dieren. Echter het toepassen van pijnstillers bij deze dieren zal het immuunsysteem beïnvloeden<sup>19</sup>. Het is bekend dat NSAIDs de ontstekingsreactie direct beïnvloeden en daarmee het ziekte model nadelig beïnvloeden. Maar ook het gebruik van opioïden kan de immuunreactie beïnvloeden. Buprenorfine wordt vaak beschreven als een veilig alternatief met weinig effect op het immuunsysteem, echter ook buprenorfine kan de inductie van artritis nadelig beïnvloeden in sommige modellen, aangezien voor de modellen die gebruikt worden in deze aanvraag het effect van buprenorfine niet voldoende onderzocht is zal dit niet worden toegepast. Aangezien immunologische parameters bepalen zijn voor de uitkomsten van het onderzoek is het in deze dieren net mogelijk pijnstilling toe te passen.

---

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

Scheren en sensibiliseren van de dieren voor dermatitis zal onder anaesthesie plaatsvinden

---

## I. Overige aantasting van het welzijn en maatregelen

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Het ontwikkelen van dermatitis zal aanleiding zijn voor het ontwikkelen van ongerief. Het ontwikkelen van anafylactische reacties in het dermatitis model zijn niet beschreven.
2. Handeling van de dieren meerdere malen per week ten behoeven van arthritis score

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Ontsteking van de huid geeft irritatie en mogelijk jeuk.
2. Handeling geeft stress, echter het mogelijk ongerief van de arthritis maakt vaker hanteren van de dieren noodzakelijk

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.

Voor de arthritis score geldt een maximum score van 16 per dier. Ieder poot kan een score van 4 punten halen. Score 1 matige roodheid en zwelling aan 1 teen of de poot. Score 2 roodheid en zwelling aan de poot of aan maximaal 2 tenen. Score 3: roodheid en zwelling aan de poot en maximaal 3 tenen of milde zwelling van de poot en maximaal 4 tenen. Score 4: roodheid en zwelling aan zowel de poot als 4 tenen. Een score van 12 wordt beschouwd als een humaan eindpunt.

Voor het dermatitis model wordt gekeken naar het ontwikkelen van dermatitis, duidelijke jeuk (continue krabben) en het openkrabben van de huid worden aangehouden als humaan eindpunt.

Naast model specifieke humane eindpunten wordt ook gekeken naar algemeen welbevinden van de dieren, op basis duidelijke veranderingen in uiterlijk, gewicht of gedrag zullen de dieren worden geuthenaseerd. Hierbij wordt gelet op bol zitten, roodheid rond de ogen en lusteloosheid voor een periode van > 24 uur wordt beschouwd als humaan eindpunt. In het geval van een indicatie van gewichtsverlies worden de dieren gewogen en bij >15% gewichtsverlies in 2 dagen is het HEP bereikt..

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

In het geval van arthritis is het te verwachten aantal dieren dat het HEP bereikt ongeveer 10%

In het geval van dermatitis is het ontwikkelen van de ziekte gelijk aan het bereiken van het HEP in dit geval zal tussen de 25 en maximaal 70% van de dieren het HEP bereiken (afhankelijk van de effectiviteit van de therapie).

Voor donor dieren is niet te verwachten dat het HEP bereikt wordt.

## 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.

Arthritis model: 25% licht, 75% van de dieren zullen tot matig ongerief hebben

Dermatitis model: 56% licht ongerief en in maximaal 44% van de dieren tot matig ongerief

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Na afloop van het experiment worden de immuun relevante organen geïsoleerd uit de dieren voor verder analyses.

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 : 2015.II.811.050
2. Titel van het project : "Nieuwe immuun therapie voor chronische ontstekingen"
3. Titel van de NTS : Nieuwe therapie voor chronische ontstekingsziekten

#### 4. Type aanvraag:

- nieuwe aanvraag projectvergunning
- wijziging van vergunning met nummer :

#### 5. Contactgegevens DEC

- Naam DEC : DEC Utrecht
- Telefoonnummer contactpersoon : 088 – 75 59 247
- Emailadres contactpersoon : dec-utrecht@umcutrecht.nl

#### 6. Adviestraject (data dd-mm-jjjj):

- ontvangen door DEC: 15-01-2016
- aanvraag compleet:
- in vergadering besproken: 20-01-2016
- anderszins behandeld: per mail: 28-01-2016
- termijnonderbreking(en) van / tot : 22-01-2016 tot 28-01-2016
- besluit van CCD tot verlenging van de totale adviestermijn met max. 15 werkdagen:
- aanpassing aanvraag:
- advies aan CCD: 08-03-2016

#### 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: 22-01-2016
- Strekking van de vragen:

### Niet Technische Samenvatting

- 3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: In de vijfde regel spreekt u over de patiënt, terwijl het over de muis gaat. Graag aanpassen, bijvoorbeeld naar 'het zieke dier'.

#### Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: De DEC adviseert u 'chronische ontstekingsziekten' te vervangen door 'chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten'. Graag aanpassen.
- 3.1 Achtergrond: De DEC merkt op dat de grafiek onvolledig is opgenomen in de aanvraag (assen en invulling ontbreken), graag aanpassen.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Deel 2: U noemt hier dat u maximaal twee kweekmethodes kiest, maar spreekt in bijlage 1 over drie methodes. Graag consistent invullen.

#### Bijlage 2

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC adviseert u meer aandacht te besteden aan de ratio van het opnemen van de twee andere ontstekingsmodellen. Tevens verzoekt de DEC u een go/no go-moment te beschrijven worden voor het gebruik van de andere modellen, inclusief de criteria. Graag aanpassen.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC verzoekt u te benoemen dat het door u te gebruiken artritismodel een relatief licht model is.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De DEC adviseert u de samenhang tussen de verschillende modellen beter te beschrijven in de aanvraag.
- J. Humane eindpunten: De DEC acht het feit dat maximaal 70% van de dieren in het dermatitismodel het HEP bereikt, erg hoog. Graag uw visie.
- K. Classificatie van ongerief: De DEC verzoekt u toe te lichten dat de 75% gaat over de dieren in het dermatitismodel. Graag de classificatie uitsplitsen per model.

#### Bijlage 3

- J. Humane eindpunten: De DEC verzoekt u de humane eindpunten uit te splitsen naar de verschillende modellen.

- Datum antwoord: 28-01-2016
- Strekking van de antwoorden:

#### Niet Technische Samenvatting

3.2 Opbrengsten project en wetenschappelijke en/of maatschappelijke belang: Dit is aangepast.

#### Projectvoorstel

- 3.1 Achtergrond: In alle gevallen is dit aangepast en met geel gemarkeerd.
- 3.1 Achtergrond: In de door ons her-ingediende versie zijn de assen zichtbaar.
- 3.4 Onderzoeksstrategie: Aangepast en met geel gemarkeerd.

## Bijlage 2

- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: De keuze voor de 2 modellen is gebaseerd op de hypothese dat [REDACTED] therapie bij meerdere typen ontstekingen effectief kan zijn in het induceren van [REDACTED] cellen en het herstellen van de immuun balans. We willen dit bevestigen door een [REDACTED] therapie die effectief is in het onderdrukken van artritis (een overwegend Th1 type ontsteking) te testen in een chronisch ontsteking model waaraan een ander type ontsteking ten grondslag ligt, namelijk het dermatitis model dat uitgaat van een TH2 type ontsteking. Daarnaast willen we ook bevestigen dat de door ons effectief geteste [REDACTED] therapie in de muis humaan relevant kan zijn. Hiervoor willen we gebruik maken van het humane transplantatie model waarbij een humaan immuunsysteem in de muis wordt gebracht en vervolgens de ontsteking reactie en de onderdrukking hiervan wordt geanalyseerd. Hoewel het hier wel een muis model betreft, krijgen we een beter beeld van de complexe interacties van het humane immuunsysteem. Juist dit aspect van [REDACTED] therapie in combinatie met een [REDACTED] in verschillende chronische ontstekingsziekten zou van grote meerwaarde kunnen zijn voor het ontwikkelen van [REDACTED] therapie voor humane patiënten. Om te onderzoeken of de hypothese correct is willen we 1 type [REDACTED] in 1 dosering die effectief is gebleken in het artritis model testen in andere ontstekingsmodellen. Aangezien artritis een overwegend Th1 type ontsteking is hebben we gekozen om een chronisch (auto-immuun) ontstekingen model te nemen met een ander type ontsteking, het dermatitis model. Dermatitis een meer gemengde Th2 ontsteking. Door juist duidelijk verschillende typen ontsteking te kiezen kunnen deze experimenten de vraag beantwoorden of [REDACTED] therapie voor meerdere chronische ontstekingen gebruikt kan worden in de toekomst. Als derde model willen we de mogelijke translatie naar de humane patiënt beter in kaart brengen en hiervoor hebben we gekozen voor een zogeheten gehumaniseerd muis model. In dit wordt gebruik gemaakt van [REDACTED] muis waarin humane immuuncellen worden getransplanteerd om deze muis een humaan immuunsysteem te geven en vervolgens te kijken naar een transplantatie afstotingen. Ook in dit model is de ontsteking overwegend een Th1 type ontsteking. De [REDACTED] therapie zal alleen in de laatste 2 genoemde modellen getest worden als blijkt dat deze effectief is in het onderdrukken van de ziekte in het artritis model.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: Dat is toegevoegd aan de tekst.
- A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters: We hopen dat met het antwoord op de eerste vraag m.b.t. bijlage 2 en de bijbehorende aanpassingen in de projectaanvraag de samenhang tussen de modellen helderder is geworden.
- J. Humane eindpunten: Het klopt dat het aantal dieren dat in het dermatitis model het HEP bereikt erg hoog is. Dit is het gevolg van de formulering van het HEP. Het dermatitis model is een chronisch en progressief ontstekingsmodel en de ontsteking van de huid gaat samen met het ontwikkelen van jeuk. Het progressieve karakter van de ziekte betekend dat zodra de dieren jeuk krijgen gaat deze niet meer weg en zullen de dieren blijven krabben, met als gevolg dat dieren uiteindelijk ook de huid kunnen openkrabben. Aangezien we willen

voorkomen dat dieren eventueel secundaire infecties ontwikkelen hebben we gekozen voor een vroeg HEP, namelijk het ontwikkelen van de ziekte. Om dit te verduidelijken hebben we de tekst iets aangepast.

- K. Classificatie van ongerief: Dit is aangepast en toegelicht.

### Bijlage 3

- J. Humane eindpunten: In bijlage 3 hebben we het ongerief van beide modellen genoemd. In bijlage 3 worden allen het artritis model en dermatitis model getest.
- De antwoorden hebben geleid tot aanpassing van de aanvraag: Ja

## 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 (dierproeven in de zin der wet).
2. De aanvraag betreft een nieuwe aanvraag.
3. De DEC is competent om hierover te adviseren.
4. Er zijn geen DEC-leden betrokken bij het betreffende project.

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

### 1. 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 is in overeenstemming met de hoofddoelstellingen.

### 3. De DEC onderschrijft het belang van de doelstelling. In chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is sprake van een foutieve immuun-regulatie waardoor een auto-immuun ontsteking plaatsvindt tegen lichaamseigen antigenen. De huidige therapie bestaat uit algehele aspecifieke immuun-suppressie en gaat gepaard met een toegenomen kans op infecties, tumoren en het ontwikkelen van therapie resistentie. Om de immuun-regulatie weer in balans te krijgen kunnen [REDACTED] worden gebruikt. Deze [REDACTED]

█ cellen zijn in het lichaam van groot belang bij het herstellen van de immuunregulatie █. Er zijn verschillende manieren om █ in te zetten als mogelijke therapie voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten, namelijk als celtherapie of als vaccin. In diermodellen voor chronische ontsteking is aangetoond dat █ ziekte kunnen voorkomen en een initiële humane fase I trial dat het toedienen van █ in principe veilig is in artritis patiënten. Momenteel is het alleen niet bekend welke eigenschappen van de █ cruciaal zijn █ chronische ontstekingen. Het huidige project beoogt om de eigenschappen van *in vitro* gekweekte █ in kaart te brengen voor de ontwikkeling van een effectieve en veilige celtherapie. Daarnaast zal in dit project worden onderzocht of het mogelijk is een █ vaccin in te zetten om *in vivo* via █ en daarmee de immuun-balans te herstellen. De vaccinatie zorgt dat █ cellen geïnduceerd worden *in vivo* tegen het vaccin eiwit, bijvoorbeeld door de aanwezigheid van een █ adjuvans. Het ontwikkelen van mogelijke nieuwe therapieën om langdurige tolerantie te creëren en daarmee langdurig herstel van de immuun-balans in patiënten met chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten 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. De onderzoeksgroep heeft ervaring met het kweken van █ afkomstig uit het beenmerg van muizen en aangetoond dat een bepaald type *in vitro* gekweekte █-cellen kan induceren. Het is nog onbekend of dit type *in vitro* gekweekte █ ook *in vivo* effectief is tijdens chronische ontstekingen. Op dit moment zijn verschillende protocollen gepubliceerd voor het kweken van █ die mogelijk *in vivo* chronische ontsteking kunnen onderdrukken. In het eerste deel van dit project (bijlage 1) zullen de verschillende protocollen met elkaar worden vergeleken en de effectiviteit en karakteristieken van de verschillende typen █ worden bepaald. De twee typen █ die het meest effectief zijn in het █-cellen zullen vervolgens worden ingezet als celtherapie in een model voor artritis (bijlage 2). Alleen het type █ (in 1 dosering) dat effectief is gebleken in het onderdrukken van ziekte in het artritis model zal vervolgens worden onderzocht in dermatitis en een gehumaniseerd muizenmodel (go/no-go moment). In de verschillende chronische ontstekingsmodellen die onderzocht worden zal een ander type ontsteking plaatsvinden, overwegend Th1 type ontsteking in artritis en een meer gemengde Th2 ontsteking in dermatitis. Voor het █ wordt █ huid naar █ muizen getransplanteerd waarna █ immuuncellen worden toegediend om zo in de muizen een █ immuunsysteem te creëren, vervolgens wordt de ontstekingsreactie bestudeerd. Door de effectiviteit van █ therapie in verschillende ontstekingstypen te onderzoeken kan bepaald worden of deze therapie in de toekomst voor verschillende chronische ontstekingsziekten kan worden ingezet. Met de kennis verkregen uit de *in vitro* en eerdere *in vivo* studies kan gericht bepaald worden welke █ cellen getarget moeten worden met een █ vaccin (bijlage 3). Hiervoor zullen █ gecombineerd worden met ziekte relevante antigenen en worden toegediend tijdens chronische

ontsteking *in vivo* (arthritis en dermatitis model). De DEC is ervan overtuigd dat de aanvrager over voldoende expertise en voorzieningen beschikt om de projectdoelstelling met de gekozen aanpak binnen de gevraagde termijn te realiseren.

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

- Bedreigde diersoort(en) (10e lid 4)
- Niet-menselijke primaten (10e)
- Dieren in/uit het wild (10f)
- Gefokt voor dierproeven (11)
- Zwerfdieren (10h)
- Hergebruik (1e lid 2)
- Huisvesting en verzorging
- Locatie: instelling vergunninghouder (10g)

6. Het ongerief als gevolg van de dierproeven is realistisch ingeschat en geclassificeerd. De muizen die dienen als donor voor de ██████ die gebruikt zullen worden in de experimenten beschreven in bijlagen 1 (100%), 2 (33%) en 3 (54%) ondervinden licht ongerief. Deze donormuizen worden zonder voorafgaande handelingen getermineerd. Het ongerief van de experimentele dieren is afhankelijk van de effectiviteit van de therapie. Voor de inschatting van het ongerief wordt ervan uitgegaan dat de helft van de therapieën effectief zal zijn om zo het ongerief niet te onderschatten. Het ongerief dat muizen ondervinden waarin chronische ontstekingsziekten worden geïnduceerd wordt als volgt ingeschat, in bijlage 2: 18% licht ongerief en 49% tot maximaal matig ongerief en in bijlage 3: 15% licht ongerief en 31% tot maximaal matig ongerief. Binnen het gehele project zal 62% van de muizen licht ongerief ondervinden en 28% maximaal matig ongerief.

Binnen het arthritis en transplantatie model wordt verwacht dat ongeveer 10% van de muizen het humane eindpunt bereikt. Binnen het dermatitis model wordt verwacht 25-70% van de muizen het humane eindpunt bereikt. Het dermatitis model is een chronisch en progressief ontstekingsmodel en de ontsteking van de huid gaat samen met het ontwikkelen van jeuk. Het progressieve karakter van de ziekte heeft tot gevolg dat wanneer de dieren jeuk krijgen deze niet meer weggaat en de dieren zullen blijven krabben, met als gevolg dat dieren uiteindelijk ook de huid kunnen openkrabben. Daarom is ervoor gekozen dat met het ontwikkelen van ziekte het humane eindpunt is bereikt.

7. Er zijn geen methoden die de voorgestelde dierproeven geheel of gedeeltelijk zouden kunnen vervangen. Door de complexiteit van een immuunrespons is het niet mogelijk deze met een computermodel te simuleren. Zowel voor ██████ cellen zijn geen cellijnen beschikbaar die *in vivo* studies kunnen vervangen. Het gebruik van ██████ ██████ hybridoma's is niet wenselijk omdat in deze hybridoma's alleen ██████-cel activatie geanalyseerd kan worden en niet de inductie of effectiviteit van ██████ cellen.

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. Om het aantal *in vivo* te testen [REDACTED] te beperken, zullen de verschillende typen [REDACTED] eerst uitvoerig *in vitro* worden bestudeerd en gekarakteriseerd.
  
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. Alleen de effectief gebleken therapeutische toepassing van [REDACTED] zal in diermodellen voor chronische ontsteking worden bestudeerd. Het gehumaniseerde muizenmodel voor transplantatie is gekozen om de complexe interacties van het humane immuunsysteem beter te kunnen onderzoeken wat essentieel is voor de translatie naar de humane patiënt.  
Voor het dermatitis en transplantatie model zullen volwassen muizen van beide seksen gebruikt worden met een leeftijd tussen de 6-12 weken, omdat in deze dieren het immuunsysteem volledig ontwikkeld is. Alleen in arthritis model zullen muizen ouder dan 16 weken en bij voorkeur gepensioneerde fokvrouwen worden gebruikt, omdat deze vrouwelijke muizen de hoogste gevoeligheid hebben voor het ontwikkelen van arthritis. De DEC heeft gediscussieerd over het geslacht van de dieren. Gezien het feit dat er sprake is van een proof-of-concept studie, kan de DEC zich vinden in de argumentatie om in het arthritis model te kiezen voor het gebruik van één sekse.
  
10. De niet-technische samenvatting is een evenwichtige weergave van het project en begrijpelijk geformuleerd.

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

De DEC is unaniem van mening dat het wetenschappelijke en maatschappelijke belang van dit project opweegt tegen het ongerief dat de muizen zullen ondervinden. De huidige behandeling van patiënten met chronische ontstekingsziekten waarbij de balans van immuunsysteem verstoord is, is gebaseerd op het onderdrukken van het immuunsysteem en gaan gepaard met bijwerkingen zoals het frequenter ontstaan van infecties en tumoren. De DEC is van mening dat het uitgebreid onderzoeken en karakteriseren van [REDACTED] zal bijdragen aan het ontwikkelen van mogelijke therapeutische toepassingen voor het behandelen van patiënten met chronische ontstekingsziekten zoals [REDACTED] celtherapie of vaccinatie gericht op [REDACTED]. Het gebruik van verschillende diermodellen voor chronische ontsteking waarbij dieren licht (62%) tot matig ongerief (28%) ondervinden is in de ogen van de DEC noodzakelijk om de effectiviteit van [REDACTED] therapie in verschillende typen ontstekingen die plaatsvinden bij chronische ontstekingsziekten te bepalen. Voor het inzetten van meerdere ontstekingsmodellen zijn duidelijke criteria voor go-no go momenten bepaald. De mogelijkheden tot vervanging, vermindering en verfijning van dierproeven zijn onderzocht en optimaal toegepast binnen de onderzoeksstrategie. Daarnaast zijn de humane eindpunten zo bepaald dat de muizen onnodig ongerief bespaard blijft. Dit alles brengt de DEC tot



het oordeel dat het belang van de doelstellingen opweegt tegen het lichte tot matige ongerief dat de muizen in dit project zullen ondervinden, en dat het gebruik van de muizen ethisch aanvaardbaar is.

### **E. Advies**

1. Advies aan de CCD

De DEC adviseert de vergunning niet te verlenen vanwege:

De DEC adviseert de vergunning te verlenen onder de volgende voorwaarden

De DEC adviseert de vergunning te verlenen.

2. Het uitgebrachte advies is gebaseerd op consensus.

### **Dierexperimentencommissie Utrecht**





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

[REDACTED]

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD108002016467

**Bijlagen**

2

Datum 17 maart 2016

Betreft Ontvangstbevestiging aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Wij hebben uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen op 15 maart 2016.

Het aanvraagnummer dat wij aan deze aanvraag hebben toegekend is AVD108002016467. 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: 10800  
Naam instelling of organisatie: Universiteit Utrecht  
Naam portefeuillehouder of diens gemachtigde: [REDACTED]  
KvK-nummer: 30275924  
Postbus: 12007  
Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT  
IBAN: NL27INGB0000425267  
Tenaamstelling van het rekeningnummer: Universiteit Utrecht

Gegevens verantwoordelijke onderzoeker

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

**Over uw aanvraag**

Wat voor aanvraag doet u?  Nieuwe aanvraag  
 Wijziging op een (verleende) vergunning die negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn  
 Melding op (verleende) vergunning die geen negatieve gevolgen kan hebben voor het dierenwelzijn

**Over uw project**

Geplande startdatum: 1 mei 2016  
Geplande einddatum: 1 mei 2021  
Titel project: Nieuwe immuuntherapie voor chronische ontstekingen  
Titel niet-technische samenvatting: Nieuwe therapie voor chronische ontstekingsziekte  
Naam DEC: DEC Utrecht  
Postadres DEC: Postbus 85500 3508 GA Utrecht  
E-mailadres DEC: dec.utrecht@umcutrecht.nl

**Betaalgegevens**

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

**Checklist bijlagen**

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

**Ondertekening**

Naam:   
Functie:   
Plaats: Utrecht  
Datum: 14 maart 2016



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

UU-ASC  
Postbus 80011  
3508 TA UTRECHT  


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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD108002016467  
**Bijlagen**  
2

Datum 17 maart 2016  
Betreft Factuur aanvraag projectvergunning Dierproeven

**Factuur**  
Factuurdatum: 17 maart 2016  
Vervaldatum: 16 april 2016  
Factuurnummer: 16700467  
Ordernummer: CB.841910.3.01.011

| Omschrijving   | Bedrag     |
|--|------------|
| Betaling leges projectvergunning dierproeven<br>Betreft aanvraag AVD108002016467 | € 1.441,00 |

Wij verzoeken u het totaalbedrag vóór de gestelde vervaldatum over te maken op rekening NL41RBOS 056.999.6317 onder vermelding van het factuurnummer en aanvraagnummer, ten name van Centrale Commissie Dierproeven, Postbus 93144, 2509 AC te 's Gravenhage.



> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

████████████████████  
████████████████████  
Postbus 12007  
3501 AA Utrecht

**Centrale Commissie  
Dierproeven**

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

**Onze referentie**  
Aanvraagnummer  
AVD108002016467

**Uw referentie**  
uw ref

**Bijlagen**  
1

Datum 15 april 2016  
Betreft Aanvulling Aanvraag projectvergunning dierproeven

Geachte ██████████

Op 15 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nieuwe immuuntherapie voor chronische ontstekingen" met aanvraagnummer AVD108002016467. 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 een tikfout in 3.5 (en dat geldt als licht ongerief). U kunt binnen veertien dagen een nieuwe Niet technische samenvatting sturen. Indien uw aanvraag wordt toegewezen zal de nieuwe Niet technische samenvatting op onze website geplaatst worden, of de bij uw aanvraag ingestuurde versie indien u geen nieuwe Niet technische samenvatting stuurt. U kunt de Niet technische samenvatting aanleveren via NetFTP. Stuurt u het per post op, gebruik dan het formulier dat u bij deze brief krijgt.

**Onduidelijkheden**

- 1) In bijlage 1 beschrijft u niet of u mannelijke/vrouwelijke dieren of dieren van beide geslachten zult gebruiken. Graag dit vermelden en indien u gebruik maakt van slechts 1 geslacht, dit onderbouwen.
- 2) In bijlage 2 beschrijft u onder B voor artritis een totaal aantal van 1782+594 dieren, terwijl bij de bovenstaande beschrijving u uitgaat van 1782+648 dieren. Graag consistent maken en indien nodig de NTS hierop aanpassen.
- 3) In bijlage 2 beschrijft u onder B voor overige ontstekingsmodellen een totaal aantal van 96+127 dieren, terwijl bij de bovenstaande beschrijving u uitgaat van 96+126 dieren. Graag consistent maken en indien nodig de NTS hierop aanpassen.
- 4) In bijlage 2 beschrijft u geen verfijning van de dierproeven. Dit graag aanvullen.

- 5) In bijlage 3 beschrijft u wel verfijning voor het artritismodel, maar zegt u niets over verfijning van het dermatitis model. Graag aanvullen.
- 6) In bijlage 3 is niet ingevuld of er in het voorgaande gebruik sprake is van ernstig ongerief. Graag invullen.

**Datum**

15 april 2016

**Onze referentie**

Aanvraagnummer  
AVD108002016467

**Opsturen binnen veertien dagen**

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

**Wanneer een beslissing**

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

**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





## 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.
- U kunt meerdere mogelijkheden kiezen.*
- Fundamenteel onderzoek
- Translationeel of toegepast onderzoek
- Wettelijk vereist onderzoek of routinematige productie
- Onderzoek ter bescherming van het milieu in het belang van de
- Onderzoek gericht op het behoud van de diersoort
- Hoger onderwijs of opleiding
- Forensisch onderzoek
- Instandhouding van kolonies van genetisch gemodificeerde dieren, niet gebruikt in andere dierproeven

### 3 Algemene projectbeschrijving

#### 3.1 Achtergrond

Licht het project toe. Beschrijf de aanleiding, de achtergrond en de context. Besteed aandacht aan de bij vraag 2 aangekruiste categorieën.

- Geef in geval van 'wettelijk vereiste dierproeven' aan welke wettelijke eisen (in relatie tot beoogd gebruik en markttoelating) van toepassing zijn.
- Geef in geval van 'routinematige productie' aan welk(e) product(en) het betreft en voor welke toepassing(en).
- Geef in geval van 'hoger onderwijs of opleiding' aan waarom in dit project, in relatie tot het opleidingsprogramma en eindtermen, is gekozen voor dierproeven.

In de westerse wereld is er toename aan patiënten met **chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten** (zoals bijvoorbeeld reumatoïde artritis en dermatitis). Alleen reumatoïde artritis treft ongeveer 1% van

alle volwassenen. Het probleem in deze chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is de foutieve immuun regulatie in deze patiënten, die zorgt voor het ontwikkelen van een auto-immune ontsteking gericht tegen lichaamseigen antigenen. De huidige therapie in deze patiënten is gebaseerd op algehele aspecifieke immuun suppressie. Het levenslange gebruik van deze medicatie gaat gepaard met een toegenomen kans op infecties, tumoren en het ontwikkelen van therapie resistentie, en is helaas niet effectief in alle patiënten.

De ideale therapie in dergelijke chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is het herstellen van de immuun balans door het herstellen van [REDACTED]. Helaas blijkt het [REDACTED] tijdens chronische ontstekingen lastig.

[REDACTED] cellen zijn cruciaal in de immuun balans. In veel chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten is beschreven dat de [REDACTED] cellen verminderd aanwezig zijn of verminderd functioneel zijn. Door het activeren of induceren van [REDACTED] cellen gericht tegen het ziekte inducerend-antigeen kan de immuun balans hersteld worden<sup>1</sup>. [REDACTED] zijn hierbij van groot belang. [REDACTED] spelen een centrale rol in het immuunsysteem en zijn essentieel voor de inductie van een effectieve [REDACTED] cel response tegen pathogenen maar ook voor het [REDACTED] cellen in de periferie en hierdoor dragen ze bij aan het behoud van de immuun balans<sup>2</sup>.

Het exploiteren van [REDACTED] cellen als target voor immuuntherapie kan op verschillende manieren. Ten eerste kan je [REDACTED] cellen die zogeheten [REDACTED] eigenschappen hebben gebruiken als **celtherapie**. Initiële studies laten zien dat met behulp van deze [REDACTED] ziekte kan worden voorkomen in diermodellen voor chronische ontstekingen<sup>3,4,5</sup>. Daarnaast heeft een initiële fase I trials in [REDACTED] in de mens laten zien dat het geven van [REDACTED] therapie in principe veilig is in arthritis patiënten. Zij hebben geen bijwerkingen gezien tijdens de trial maar de effectiviteit kon niet beoordeeld worden in deze trials (persoonlijke communicatie).

Het probleem is dat het onduidelijk is wat de effectiviteit van een dergelijke [REDACTED] therapie tijdens chronische ontstekingen bepaald en aan welke criteria, op zowel moleculair als eiwit niveau, de [REDACTED] moet voldoen om in een patiënt met een chronische (auto-immuun) ziekte effectief en veilig te zijn. Een tweede manier om [REDACTED] cellen te gebruiken als mogelijk therapeutische route is door het ontwikkelen van een [REDACTED] vaccin. Wat we hiermee bedoelen is een vaccinatie die zorgt dat er [REDACTED] cellen geïnduceerd worden in vivo tegen het vaccin eiwit, bijvoorbeeld door de aanwezigheid van een [REDACTED] adjuvans of het gericht vaccineren via [REDACTED] routes. Vele studies hebben laten zien dat profylactisch vaccineren via mucosale routes met zelf-antigenen ziekte inductie kan voorkomen. Het therapeutisch vaccineren tijdens ziekte is echter veel minder effectief. De hypothese is dat de in vivo aanwezige [REDACTED] tijdens een chronische ontsteking veranderd zijn, maar ook hier zijn de exacte eigenschappen van de [REDACTED] cellen onbekend.

Voor dat een effectieve immuuntherapie met behulp van [REDACTED] in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten ontwikkeld kan worden is het dus cruciaal dat de eigenschappen van [REDACTED] goed in kaart worden gebracht en dat de effectiviteit van verschillende directe en indirecte therapieën vergeleken worden **tijdens** chronische ontsteking.

### 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?

1. Wat zijn de karakteristieken van en in vitro gekweekte [REDACTED] cellen [REDACTED] tijdens chronische ontsteking.

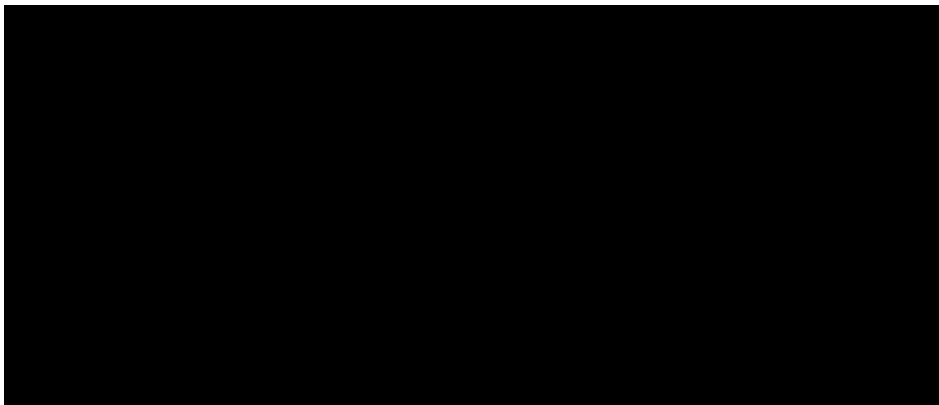
Het beantwoorden van deze vraag zal een grote stap voorwaarts opleveren voor het ontwikkelen van [REDACTED] therapie. Voor het veilig en effectief ontwikkelen van [REDACTED] therapie is het essentieel

om te weten welke factoren een [redacted] definiëren op eiwit niveau en moleculair niveau en op het niveau van cel-cel interactie. Momenteel is het niet bekend welke eigenschappen van de [redacted] cruciaal zijn om functioneel [redacted] te induceren tijdens chronische ontstekingen. Ook is onbekend welke factoren bepalen dat een [redacted] niet verandert van functie na inspuiten bij een chronische ontsteking. Dit laatste is natuurlijk cruciaal voor veilige therapie, want als een [redacted] kan veranderen kan de effectiviteit van de therapie verminderen of in het ergste geval zelfs de ziekte verergeren<sup>4</sup>. Andere vragen die beantwoord moeten worden voordat een effectieve [redacted] celtherapie in de mens kan worden toegepast tijdens ziekte, is wat de ideale omstandigheden zijn voor therapie zoals, route van toediening, frequentie van behandeling, dosis van behandeling, antigeen belading van de [redacted] en welk kweek protocol het meest effectief is.

2. Kunnen we tijdens chronische ontsteking een [redacted] vaccin inzetten om in vivo via [redacted] [redacted] cellen te induceren en zo de immuun balans te herstellen.  
In dit deel van het onderzoek zal gekeken worden of het mogelijk is een therapeutisch vaccin te ontwikkelen waarmee in [redacted] getarget kunnen worden en aan welke voorwaarden een dergelijk vaccin moet voldoen. Dit zal gedaan worden op basis van het maken van verschillende combinaties eiwit adjuvans en/of verschillende routes van toediening van het therapeutisch vaccin. Daarnaast zal ook gekeken worden naar het type [redacted] dat tijdens de vaccinatie bereikt wordt in vivo en welke [redacted] essentieel zijn voor een [redacted] vaccinatie.

#### Haalbaarheid:

In dit project willen we een aantal fundamentele vragen beantwoorden die nodig zijn voor het ontwikkelen van [redacted] therapie in de toekomst. Binnen de onderzoeksgroep hebben we al aangetoond met behulp van in vitro onderzoek dat een bepaald type in vitro gekweekte [redacted] cellen kunnen induceren (figuur 1), maar of deze cellen ook in vivo effectief zijn is onbekend.



*Figuur 1:* [redacted] zijn gekweekt vanuit beenmerg van muizen in aanwezigheid van [redacted] en [redacted]. Deze [redacted] hebben [redacted] moleculen aan het oppervlak ([redacted]) die zorgen voor [redacted] cellen. Daarnaast bleken [redacted] cellen gestimuleerd met deze [redacted] s meer [redacted] te hebben (een marker voor [redacted] cellen).

[redacted]. Uit dit onderzoek is gebleken dat [redacted] kunnen onderdrukken wanneer profylactisch toegediend, helaas bleken deze [redacted] niet in staat chronische (auto-immuun) ziekte te onderdrukken. In de literatuur zijn momenteel meerdere [redacted] kweek protocollen beschreven die mogelijk wel een chronische ontsteking kunnen onderdrukken en juist deze zouden we in detail willen bestuderen in dit project<sup>3,7</sup>. Door het vergelijken van verschillende [redacted] protocollen en analyseren van de effectiviteit van verschillende [redacted] [redacted] tijdens chronische ontsteking, zowel in vitro als in vivo, kunnen we in dit project duidelijk aantonen welke [redacted] langdurig [redacted] kunnen induceren tijdens chronische ontsteking. Door het vergelijken van

de moleculaire en eiwit profielen van deze cellen kunnen we zeer gedetailleerd in kaart brengen aan welke eigenschappen een effectieve [REDACTED] moet voldoen. Deze kennis kan gebruikt worden om een biomarker te ontwikkelen voor het testen van [REDACTED] voor humane therapeutische toepassing. In humane geneeskunde is het belangrijk om, voordat de therapie wordt toegepast, te weten of de celtherapie effectief en veilig is iedere keer dat een individuele patiënt behandeld wordt.

Daarnaast is binnen de onderzoeksgroep de afgelopen jaren veel onderzoek gedaan naar het ontwikkelen van mogelijke [REDACTED] vaccinaties. We hebben hierbij onder andere gekeken naar [REDACTED] toediening van zelf eiwitten ter voorkoming van ziekte [REDACTED] of specifiek gericht targeten van [REDACTED]. Via beide routes werd het ontstaan van artritis verminderd door het induceren van [REDACTED] cellen. Helaas bleken beide methoden minder effectief als therapie dan profylactisch. Wat de oorzaak is van deze verminderde effectiviteit willen we graag uitzoeken door de [REDACTED] goed in kaart te brengen.

Een laatste punt waar we binnen de onderzoeksgroep naar gekeken hebben is of er mogelijk [REDACTED] adjuvantia beschikbaar zijn. Eerste aanwijzingen naar het gebruik van PLGA (poly-lactic-co-glycolic acid) partikels wees uit dat deze gebruikt kunnen worden om [REDACTED] inducerende capaciteit van een vaccin te verhogen [REDACTED], door het moduleren van [REDACTED] die behandeld werden met PLGA partikels brachten meer retinaldehyde dehydrogenase tot expressie, wat mogelijk een rol speelt in het induceren van regulerende T cellen<sup>11</sup>.

Deze voorgaande studies die aansluiten bij de huidige aanvraag geven aan dat binnen de onderzoeksgroep de ervaring aanwezig is die noodzakelijk is voor het succesvol uitvoeren van het project.

Naast het gebruik van technieken en vaardigheden die beschikbaar zijn binnen de onderzoeksgroep zullen we gebruik maken van uitgebreide samenwerkingen nationaal en internationaal. Binnen het onderzoek naar [REDACTED] therapie is er vanuit de EU een werkgroep opgericht die AFFACT heet. In deze werkgroep wordt 2 maal per jaar overlegd over het onderzoek naar [REDACTED] en de problemen en oplossingen die men heeft gevonden. Als actieve deelnemers aan deze werkgroep zijn we snel op de hoogte van de nieuwste ontwikkelingen en kunnen hier actief op inspringen.

Voor het ontwikkelen van een [REDACTED] model zoals verderop beschreven in bijlage 2, zullen we gebruik maken van de expertise van de groep uit [REDACTED] die dit model heeft opgezet en daar eerst de techniek en het model leren voordat we dit zelf zullen toepassen.

---

### 3.3 Belang

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

Het wetenschappelijk belang van deze studie is dat momenteel niet bekend is aan welke parameters een [REDACTED] moet voldoen om veilig en effectieve therapie te effectueren tijdens een chronische ontsteking. Ook is momenteel niet bekend of het mogelijk is een [REDACTED] vaccin in te zetten als therapie tijdens chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten. Deze kennis is van groot belang om deze therapie in de toekomst mogelijk te maken. De ontwikkeling van een mogelijke biomarker die vooraf effectiviteit en veiligheid van de celtherapie kan voorspellen bij de individuele patiënt is van groot belang om deze vorm van therapie in de toekomst mogelijk te maken. Het maatschappelijk belang zit in het induceren van langdurige [REDACTED] in de groter wordende groep mensen met chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten, zoals patiënten met reumatoïde artritis, dermatitis, diabetes, colitis of MS. De kennis vanuit deze studie kan bijdragen aan de toekomstige ontwikkeling van een langdurig herstel van de immuun balans in vele patiënten met chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten op de lange termijn.

---

### 3.4 Onderzoeksstrategie

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

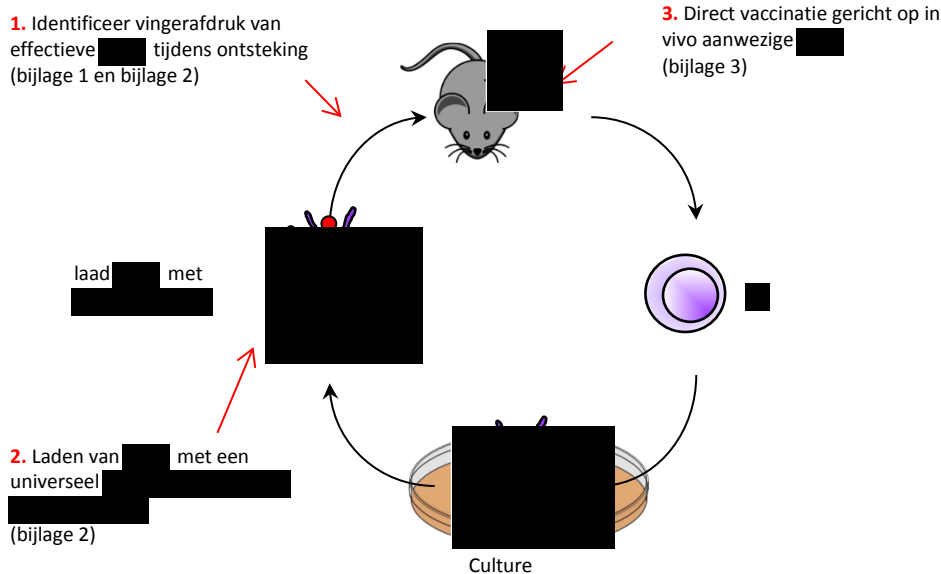
Binnen de studie willen we kijken of we een therapie kunnen ontwikkelen die een chronisch (auto-immuun) ontstekingsmodel zoals artritis kan onderdrukken.

In het eerste deel (bijlage 1) van het onderzoek willen we verschillende in vitro kweek protocollen voor het kweken van mogelijke [redacted] met elkaar vergelijken. In de literatuur zijn verschillende [redacted] protocollen beschreven [redacted]. Het betreft vaak een gemengde cel populatie waarin ook [redacted] aanwezig zijn<sup>13</sup>. Hoewel het voor het onderzoek belangrijker is dat de cellen [redacted] zijn dan welk [redacted] exact aanwezig is, zal dit wel meegenomen worden in de karakterisatie van de cellen. Door de protocollen met elkaar in vitro te vergelijken kunnen we de meest veelbelovende selecteren voor verder in vivo onderzoek. [redacted] zullen in vitro gekweekt worden en hun oppervlakte markers zullen gekarakteriseerd worden met behulp van flowcytometrie analyse. Tevens zullen we [redacted] productie en [redacted] analyseren. Deze [redacted] zijn van groot belang voor [redacted] en geven informatie over het functioneren van de [redacted]. Door het gebruik van qPCR, mRNA analyse en het gebruik van microarrays zullen we tevens de moleculaire vingerafdruk van deze cellen in kaart brengen. Juist deze laatste gedetailleerde analyse zal informatie geven welke unieke eigenschappen een [redacted] heeft. Naast het in kaart brengen van het fenotype van de gekweekte [redacted] willen we ook analyseren of de [redacted] in vitro [redacted] cellen kan induceren. Hiertoe zullen naieve [redacted] cellen (geïsoleerd uit een [redacted] muis) gekweekt worden in aanwezigheid van [redacted] en [redacted]. Na afloop zullen we de [redacted] cellen analyseren op expressie van markers die specifiek zijn voor [redacted] cellen, zoals [redacted], en hun [redacted] activiteit meten in een in vitro [redacted] assay.

In het verlengde (bijlage 2) hiervan willen we de twee typen [redacted], die in bijlage 1 getest zijn en daar effectief bleken om [redacted] cellen te induceren gebruiken, als celtherapie in vivo in chronische ontsteking. Door de [redacted] geladen met een ziekte relevant antigeen in te spuiten in diermodellen voor chronische ontstekingen zoals artritis, dermatitis en [redacted], kan het ziekteverloop worden bestudeerd. Met behulp van [redacted] muizen kunnen we ook de inductie van [redacted] cellen in vivo in detail volgen. Hiertoe worden [redacted] cellen geïsoleerd uit [redacted] muizen, gelabeld met een vitale fluorescente kleurstof en ingespoten in dieren met artritis. Deze cellen kunnen we aan het eind van de studie isoleren uit de immuun organen en bestuderen of ze [redacted] cel eigenschappen hebben gekregen.

In dit deel zullen we ook de effectiviteit van [redacted] (proteolycaan in artritis, of OVA en huisstofmijt in dermatitis) vergelijken met tolDCs geladen met [redacted]. Eerdere studies hebben laten zien dat [redacted] eiwitten verschillende chronische ontstekingen kunnen remmen en mogelijk als therapie ingezet zouden kunnen worden om [redacted] te induceren tegen chronische ontstekingen [redacted]. Om dit te bevestigen zullen we de met [redacted] [redacted] inspuiten in andere modellen voor chronische ontsteking zoals dermatitis in de muis. Om een translationele stap te zetten naar de mens willen we ook gebruik maken van een [redacted] model voor [redacted]. In dit model worden [redacted] immuun cellen in een muis gespoten na een [redacted] en acceptatie van humane huid, de immuunreactie (afstotingsreactie) die hierdoor ontstaat is te onderdrukken met [redacted] cellen. Dit model is opgezet in [redacted] en zal ook in nauwe samenwerking worden uitgevoerd. Dit model zal uitwijzen of [redacted] ook humaan effectief zijn in een gecompliceerde in vivo immuunreactie, deze stap is cruciaal voor toekomstige toepassing in humane geneeskunde.

Het laatste deel van de studie (bijlage 3) zal zich meer richten op het induceren van [redacted] cellen door direct te vaccineren met een [redacted] vaccin. Hiervoor willen we verschillende adjuvantia<sup>14</sup> (bijvoorbeeld gemodificeerde [redacted] liganden, nanoparticles, nanoparticles met immuun [redacted] stoffen/ [redacted] etc.) combineren met ziekte relevante antigenen (zoals [redacted] of proteoglycanen<sup>8</sup> in het geval van chronische ontstekingen of artritis specifiek) en dieren behandelen tijdens de ziekte. Het voordeel van deze aanpak is dat een directe vaccinatie therapie niet afhankelijk is van celkweek in gespecialiseerde ziekenhuizen en dus breder ingezet kan worden en

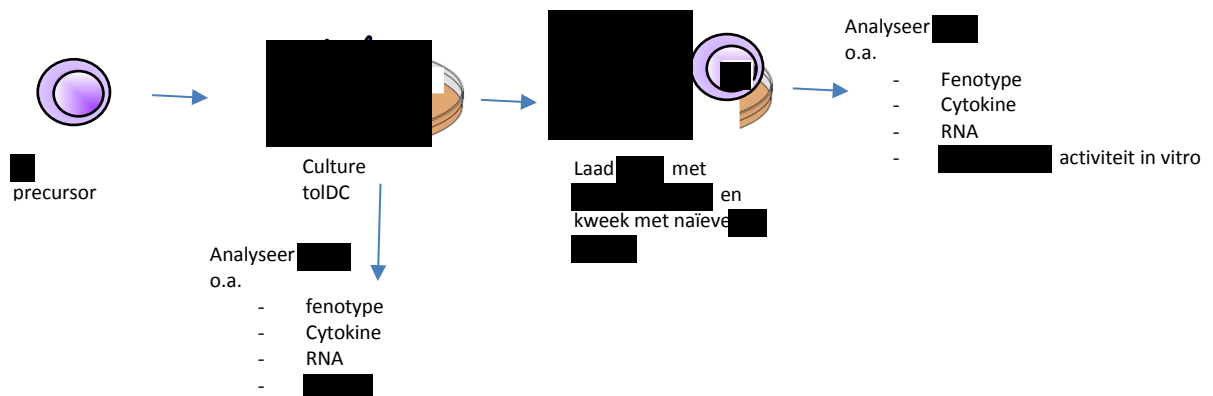


mogelijk meer patiënten kan bereiken. Met de kennis verkregen uit de andere twee delen kan gericht gekeken worden welke [redacted] cellen getarget moeten worden met een vaccin.

*Figuur 2:*

Schematische weergave van [redacted] kweek en therapie en de interactie tussen de verschillende bijlagen. [redacted] voorloper cellen worden geïsoleerd, in vitro gekweekt tot [redacted], [redacted] met [redacted]. Na analyse in bijlage 1 worden de cellen ingespoten in muizen met een chronische ontsteking in bijlage 2. In bijlage 3 wordt de mogelijkheid van celvrije therapie onderzocht door [redacted] in vivo te bereiken met behulp van een [redacted] vaccin.

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



Deel 1: In dit deel zullen we [redacted] organen uit naïeve muizen gebruiken als donor cellen voor het kweken van [redacted] in vitro. Het fenotype van de [redacted] zal beoordeeld worden met behulp van verschillende analyses zoals fluorescence activated cell sorting (FACS), microarray, luminex (voor eiwit en RNA productie), quantitative polymerase chain reaction (qPCR) en [redacted]. De in vitro functionaliteit zal beoordeeld worden met behulp van [redacted] cellen uit native donor muizen. Door [redacted] met een antigeen en [redacted] cellen te stimuleren kan beoordeeld worden wat voor [redacted] cel reactie [redacted] in vitro induceren.

*Figuur 3:* schematische weergave van de [redacted] in bijlage 1.

[redacted] precursors uit [redacted] in vitro, vervolgens worden deze direct geanalyseerd op uiterlijke kenmerken en vervolgens functioneel geanalyseerd door te kijken of ze

[redacted]. Dit wordt geanalyseerd door de [redacted] te bestuderen op fenotype, cytokine productie en ook [redacted] capaciteit in een [redacted] assay.

Deel 2: In het tweede deel zal bekeken worden of [redacted] zoals gekweekt in het eerste deel, functioneel zijn in vivo tijdens chronische ontstekingsreacties. Hier worden maximaal twee kweekmethoden gekozen, op basis van de effectiviteit van de [redacted] om in vitro [redacted] cellen te induceren. In eerst instantie zullen we dit in het proteoglycaan geïnduceerde arthritis model testen. In dit model voor chronische arthritis in de muis wordt een immuunreactie tegen het kraakbeen opgewekt door inspuiten van het kraakbeeneiwit proteoglycaan en met dit model hebben [redacted] [redacted] [redacted]. Verder hebben we de beschikking over [redacted] muizen met een specificiteit voor het ziekte inducerend proteoglycaan. [redacted]

[redacted] Hier zullen we verschillende routes van toediening (intradermaal, s.c., i.v. etc.), timing, frequenties (enkelvoudig of meervoudig) en de verschillende antigenen (bijvoorbeeld [redacted] [redacted]) met elkaar vergelijken en uitlezen op effectiviteit om de ontsteking te onderdrukken. Hierbij willen we ook het mechanisme van de therapeutische effectiviteit in kaart brengen met behulp van [redacted] cel [redacted] naar de dieren met arthritis en kijken of er inderdaad [redacted] worden en mogelijk de ziekte wordt [redacted] door deze cellen. Door de verschillende [redacted] cellen met congene markers te gebruiken en voor het transfereren te labelen met verschillende vitale fluorescente labels kunnen we deze in vivo vervolgen en aan het einde van het experiment in vitro verder analyseren. De protocollen die het meest effectief blijken willen we vervolgen ook testen in andere modellen voor chronische ontsteking zoals bijvoorbeeld [redacted] en atopische dermatitis<sup>16</sup>. Voor het [redacted] model is gekozen omdat dit een [redacted] model is waarin de [redacted] afweerreactie [redacted] bestudeerd kan worden. Dit model zal in nauwe samenwerking met een onderzoeksgroep in [redacted] worden uitgevoerd, omdat deze groep ervaring heeft met dit model. Het dermatitis model is gekozen omdat dit een chronisch ontstekingsmodel is waarmee ervaring is binnen de vakgroep en omdat dit model een ander type ontsteking geeft dan arthritis. Arthritis is een meer Th1 type ontsteking, terwijl dermatitis een meer gemengd Th2, Th1 beeld geeft. Door juist verschillende typen ontsteking te kiezen kunnen deze experimenten de vraag beantwoorden of [redacted] therapie voor meerdere chronische ontstekingen gebruikt kan worden in de toekomst. In het geval van onderzoek bij dermatitis zal het ziekte inducerend antigeen ([redacted]) vergeleken worden met [redacted] eiwit.

Deel 3: In het laatste deel willen we een [redacted] vaccin testen. Het is bekend dat via bepaalde routes [redacted] in vivo getarget kunnen worden. Bijvoorbeeld via [redacted] of [redacted] vaccinatie routes. Het is echter moeilijk om tijdens chronische ontsteking deze [redacted] te bereiken. Om dit te verbeteren willen we een vaccin combineren met een [redacted] adjuvans. De keuze voor de [redacted] adjuvantia zal gemaakt worden op basis van literatuur en eerdere resultaten vanuit de onderzoeksgroep. Een voorbeeld is [redacted] deze induceren een [redacted] in vitro<sup>10,11</sup>. Door [redacted] te combineren met [redacted] via een [redacted] route is het mogelijk een [redacted] vaccin te maken. Naast [redacted] willen we ook [redacted] liganden, PLGA en andere [redacted] al dan niet geladen met anti-inflammatoire hulpstoffen (denk hierbij aan antilichamen of [redacted] tegen ontstekingsmediatoren zoals [redacted]) of nieuwe [redacted] adjuvantia testen. Ook in dit deel van de studie zullen we het mechanisme van het vaccin en de effectiviteit van [redacted] cel inductie monitoren met behulp van de verschillende [redacted] muismodellen. Tevens zal met behulp van verschillend conditionele knock-out muizen waarin specifieke [redacted] cellen kunnen worden uitgeschakeld gekeken worden welke [redacted] in vivo essentieel is voor het bereiken van een [redacted] effect. Wanneer het [redacted] effectief is als [redacted] vaccin willen we dit herhalen in andere chronische ontstekingsmiddelen zoals, transplantatie en atopische dermatitis. Dit zijn ook modellen waar in de [redacted] een belangrijke rol speelt tijdens de ontstekingen [redacted]

Referentielijst DEC aanvraag [REDACTED]

Referenties:

1. Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 531-562
2. Ohnmacht, C., Pullner, A., King, S. B., Drexler, I., Meier, S., Brocker, T., & Voehringer, D. (2009). Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*, 206(3), 549-559.
3. Hilkens, C. M., Isaacs, J. D., & Thomson, A. W. (2010). Development of dendritic cell-based immunotherapy for autoimmunity. *International reviews of immunology*, 29(2), 156-183.
4. Hilkens, C. M. U., & Isaacs, J. D. (2013). Tolerogenic dendritic cell therapy for rheumatoid arthritis: where are we now?. *Clinical & Experimental Immunology*, 172(2), 148-157.
5. Stoop, J. N., Harry, R. A., von Delwig, A., Isaacs, J. D., Robinson, J. H., & Hilkens, C. M. (2010). Therapeutic effect of tolerogenic dendritic cells in established collagen-induced arthritis is associated with a reduction in Th17 responses. *Arthritis & Rheumatism*, 62(12), 3656-3665.
6. Spiering, R., Van Der Zee, R., Wagenaar, J., Kapetis, D., Zolezzi, F., Van Eden, W., & Broere, F. (2012). Tolerogenic dendritic cells that inhibit autoimmune arthritis can be induced by a combination of carvacrol and thermal stress. *PLoS one*, 7(9), e46336.
7. Manicassamy, S., & Pulendran, B. (2011). Dendritic cell control of tolerogenic responses. *Immunological reviews*, 241(1), 206-227.
8. Broere, F., Wieten, L., Koerkamp, E. I. K., van Roon, J. A., Guichelaar, T., Lafeber, F. P., & van Eden, W. (2008). Oral or nasal antigen induces regulatory T cells that suppress arthritis and proliferation of arthritogenic T cells in joint draining lymph nodes. *The Journal of Immunology*, 181(2), 899-906.
9. Spiering, Rachel, et al. "DEC205+ Dendritic Cell-Targeted Tolerogenic Vaccination Promotes Immune Tolerance in Experimental Autoimmune Arthritis." *The Journal of Immunology* 194.10 (2015): 4804-4813.
10. Keijzer, Chantal, et al. "PLGA nanoparticles enhance the expression of retinaldehyde dehydrogenase enzymes in dendritic cells and induce FoxP3+ T-cells in vitro." *Journal of Controlled Release* 168.1 (2013): 35-40.
11. Keijzer, Chantal, et al. "PLGA, PLGA-TMC and TMC-TPP nanoparticles differentially modulate the outcome of nasal vaccination by inducing tolerance or enhancing humoral immunity." *PLoS One* 6.11 (2011): e26684.
12. van Herwijnen, Martijn JC, et al. "Regulatory T cells that recognize a ubiquitous stress-inducible self-antigen are long-lived suppressors of autoimmune arthritis." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.35 (2012): 14134-14139.
13. Helft, Julie, et al. "GM-CSF mouse bone marrow cultures comprise a heterogeneous population of CD11c+ MHCII+ macrophages and dendritic cells." *Immunity* 42.6 (2015): 1197-1211.
14. Keijzer, Chantal, et al. "Treg inducing adjuvants for therapeutic vaccination against chronic inflammatory diseases." *Frontiers in immunology* 4 (2013).
15. de Oliveira, Vivian L., et al. "Humanized mouse model of skin inflammation is characterized by disturbed keratinocyte differentiation and influx of IL-17A producing T cells." (2012): e45509.
16. Spergel, Jonathan M., et al. "Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis." *Journal of Clinical Investigation* 103.8 (1999): 1103.
17. Van Eden, Willem, Ruurd Van der Zee, and Berent Prakken. "Heat-shock proteins induce T-cell regulation of chronic inflammation." *Nature Reviews Immunology* 5.4 (2005): 318-330.
18. Glant, Tibor T., Alison Finnegan, and Katalin Mikecz. "Proteoglycan-induced arthritis: immune regulation, cellular mechanisms, and genetics." *Critical Reviews™ in Immunology* 23.3 (2003).
19. Hawkins, Penny, et al. "Applying refinement to the use of mice and rats in rheumatoid arthritis research." *Inflammopharmacology* 23.4 (2015): 131-150.
20. Hish Jr, Gerald A., et al. "Effects of Analgesic Use on Inflammation and Hematology in a Murine Model of Venous Thrombosis." *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS* 53.5 (2014): 485.

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

Deel 1: De data uit deel 1 zullen gebruiken om de [REDACTED] kweek methoden voor deel 2 te optimaliseren.

Deel 2: slechts twee van de [REDACTED] protocollen die in deel 1 het meest effectief [REDACTED] zullen ook daadwerkelijk in vivo getest worden op therapeutische effectiviteit. De meest [REDACTED] zal vervolgens in deel 1 in nog meer detail bekeken worden met behulp van microarray analyse

Deel 3: De kennis van de eigenschappen van [REDACTED] uit 1 en 2 zal bijdragen aan mogelijkheid om in vivo [REDACTED] te karakteriseren, daarnaast zullen de kritische eigenschappen voor een [REDACTED] helpen in de zoektocht naar een effectief [REDACTED] vaccin.

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



| Volgnummer | Type dierproef   |
|------------|--|
| 1          | In vitro kweek van ██████████ en analyse van fenotype en functie                       |
| 2          | █████████ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten                      |
| 3          | Ontwikkelen van een ██████████ vaccin voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten |
| 4          |  |
| 5          |  |
| 6          |  |
| 7          |  |
| 8          |  |
| 9          |  |
| 10         |  |



## Bijlage

### Beschrijving dierproeven

- Per type dierproef moet u deze bijlage invullen en Deze bijlage voegt u bij uw projectvoorstel dierproeven.
- 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

|  |                      |  |
|--|----------------------|--|
| Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.           | 10800                |  |
| Vul de naam van de instelling of organisatie in. | Universiteit Utrecht |  |
| Vul het volgnummer en het type dierproef in.     | Volgnummer           | Type dierproef   |
| <i>Gebruik de volgnummers</i>                    | 1                    | In vitro kweek van [REDACTED] en analyse van fenotype en functie |

1.1

1.2

1.3

*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.

In auto-immuun ziekten valt het immuunsysteem cellen van het lichaam zelf aan. De belangrijkste reden voor dit probleem is dat de regulatie van het immuunsysteem niet goed meer werkt. Om deze regulatie weer op orde te krijgen kunnen ( ) worden gebruikt. Deze ( ) cellen zijn in het lichaam van groot belang bij het herstellen van de regulatie en tolerantie. Eén van de mechanismen die de ( ) kunnen gebruiken is het induceren van ( ) cellen ( ). Op deze manier kunnen specifieke immuun responsen worden onderdrukt.

In het eerste deel zullen we verschillende in vitro kweek methoden om ( ) te kweken met elkaar vergelijken. Hiertoe worden ( ) precursors geïsoleerd uit naïeve muizen die worden gedood zonder voorafgaande handelingen en vervolgens worden de cellen gekweekt in vitro.

De effectiviteit van de ( ) in vitro zal uitgelezen worden met behulp van FACS, PCR en luminex, waarbij expressie van oppervlakte markers, ( ) en gebruik van verschillende transcriptie factoren wordt beoordeeld. Daarnaast zal ook worden bestudeerd hoe effectief de ( ) zijn in het induceren van ( ) cellen. Dit zal worden getest via een co-culture van de ( ) met ( ) receptor transgene ( ) cellen welke een bekende specificiteit hebben, zoals weergegeven in figuur 3 van de projectaanvraag. ( ) cellen met een ( ) cel receptor worden geïsoleerd uit naïeve muizen specifiek voor de ( ) die gedood worden zonder voorafgaande handelingen. Daarnaast is er momenteel geen helder raamwerk bekend waaraan een veilige effectieve ( ) moet voldoen, de zogeheten ( ) vingerafdruk. Deze vingerafdruk zullen we in kaart brengen van de 2 meest effectieve kweek methoden, die het best ( ) cellen induceren in vitro en tevens effectief zijn in vivo (getest in bijlage 2). Het in kaart brengen zal gebeuren door een uitgebreide analyse uit te voeren met behulp van microarrays en RNA sequencing. Deze vraagstukken zullen beantwoord worden door middel van de experimenten zoals beschreven in deze bijlage.

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.

Alle dieren in dit deel van de projectaanvraag zullen zonder voorafgaande handelingen worden gedood en vervolgens zullen de lymfoïde organen gebruikt worden voor het isoleren van ( ) cellen en ( ) cellen.

Alle analyses zullen in vitro worden uitgevoerd.

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

Er is overwogen hoeveel dieren er nodig zijn om een aan te tonen effect te bewijzen (true difference of the means). De calculatie van de hoeveelheid dieren is gedaan met de software behandeld in de proefdiercursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). De parameters zijn per primaire uitkomst parameter voor de power analyse zijn toegelicht hieronder.

## B. De dieren

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

Voor deze experimenten zal als diersoort de muis (tussen 6-12 weken oud) gebruikt worden. In eerdere experimenten is gebleken dat het kweken van [REDACTED] uit beenmerg van muizen van deze leeftijd het meest succesvol is en de hoogste opbrengst gegenereerd. Als donor muizen voor de [REDACTED] wordt gebruik gemaakt van veel gebruikte muizen stammen zoals Balb/c, C57BL of F1 van beide stammen. Deze dieren worden aangekocht van erkende proefdierleveranciers. Deze stammen worden gebruikt omdat op deze manier de data vergelijkbaar zijn met data uit de literatuur en omdat deze stammen ook gevoelig zijn voor de ontstekingsmodellen beschreven in bijlage 2. Zo wordt het proteoglycaan arthritis model geïnduceerd in Balb/c en beide stammen zijn gevoelig voor dermatitis, maar met een hogere incidentie in C57BL model. De [REDACTED] muizen die hieronder besproken worden zijn afkomstig uit eigen fok. De muizen zijn transgeen voor een [REDACTED] receptor specifiek voor bijvoorbeeld [REDACTED] of ovalbumine, de relevante eiwitten voor de modellen die in bijlage 2 getest zullen worden. Voor de donor dieren kunnen per experiment zowel vrouwelijke als mannelijke dieren worden ingezet; er is daarbij geen voorkeur voor een van beide geslachten; de leverancier mag bepalen welke dieren geleverd worden.

Om [REDACTED] te kweken zijn beenmerg donoren nodig aangezien de [REDACTED] worden gekweekt.

In het project willen we maximaal 10 verschillende (reeds in de literatuur beschreven) [REDACTED] protocollen vergelijken<sup>3</sup>. Verschillende kweekmethoden geven verschillende type cellen, en van enkele in het verleden beschreven [REDACTED] kweekprotocollen is bekend dat deze [REDACTED] zijn, maar niet functioneel [REDACTED] kunnen induceren tijdens ontsteking<sup>6</sup>. Juist dit laatste is cruciaal om effectief als [REDACTED] therapie ingezet te kunnen worden bij patiënten. Door meerdere protocollen en de verschillende cellen die tijdens de kweek ontstaan gedetailleerd te onderzoeken in vitro onder artificiële ontstekingscondities (toevoeging van o.a. ontstekingsmediatoren aan het kweekmedium) voor we deze in vivo testen willen we het aantal gebruikte dieren zoveel mogelijk beperken en alleen de meest veelbelovende cellen in vivo testen.

In het verleden is gebleken dat we voor het opzetten van een nieuwe kweek methode ongeveer 5 muizen nodig hebben als beenmerg donor ( $5 \times 10 = 50$  muizen). Dit aantal is gebaseerd op de vergelijking van verschillende kweekmedia om de meest optimale cel aantallen na afloop van de kweek te verkrijgen, juist het kweken in aanwezigheid van [REDACTED] condities zorgt voor verminderde celopbrengsten (persoonlijke observatie). Naast het optimaliseren van de kweek condities is ook aantal cellen dat na afloop van de kweek beschikbaar is belangrijk voor analyse van oppervlakte markers, deze oppervlakte markers (bijvoorbeeld [REDACTED]) geven inzicht of de kweek daadwerkelijk [REDACTED] cellen heeft voortgebracht<sup>13</sup>.

Om voldoende [REDACTED] te kweken voor de analyse van de oppervlakte markers met behulp van FACS, cytokine productie en RNA met qPCR of [REDACTED] hebben we 5 donor dieren nodig. Dit is op basis van cel opbrengsten zoals we die in het verleden bepaald hebben binnen onze vakgroep na het kweken van [REDACTED]. Het mogelijk is dat niet alle kweekmethoden een zelfde hoeveelheid cellen zullen opleveren maar dit is vooraf niet met zekerheid vast te stellen.



Door ervaring uit eerdere experimenten met dergelijke parameters als cytokine productie en qPCR resultaten gaan we uit van een variatie (sigma (standaarddeviatie) tweezijdig) in uitkomst tussen de experimentele groepen van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie.

Het aan te tonen effect (true difference of means, effect size) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Het betrouwbaarheidsinterval (alfa) wordt gesteld op 5% omdat we in deze experimenten voornamelijk geïnteresseerd zijn in het effect ten opzichte van de controle en niet tussen de groepen onderling. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 9 experimentele eenheden moeten gebruiken. ( $9 \times 5 \times 10 = 450$  muizen)

Maximaal 2 meest veelbelovende kweekprotocollen zullen vervolgens worden getest in vivo in deel 2. Voor het transfereren van [REDACTED] met verschillende doses en frequenties zoals beschreven in deel 2 zullen gemiddeld [REDACTED] per ontvanger muis worden door gespoot. Uit een donor muis kunnen we ongeveer [REDACTED] kweken dus dit komt neer op 10 ontvanger dieren per donor en voor de 1176 ontvanger dieren in deel 2 betekend dit dus **118** muizen in totaal.

Ook zal van deze 2 methoden een microarray of een RNAseq analyse worden uitgevoerd op de [REDACTED] om een gedetailleerd beeld te krijgen van de genen die specifiek zijn voor [REDACTED]. Om voldoende RNA te verkrijgen voor de microarray analyse van de meest effectieve [REDACTED] (en de benodigde positieve en negatieve controles) zijn  $10 \cdot 10^6$  cellen nodig van minimaal 3 afzonderlijke kweken. Het aantal cellen is gebaseerd op de benodigde hoeveelheid RNA die uit de cellen geïsoleerd kan worden voor de analyse en de kwaliteitscontrole vooraf. De resultaten van drie afzonderlijke kweken worden vergeleken om de uniformiteit en reproduceerbaarheid van de resultaten te bevestigen. Zonder de analyse van 3 afzonderlijke kweken kunnen de resultaten het gevolg zijn van variatie tussen de kweken en niet specifiek voor de vingerafdruk van de [REDACTED].

Inclusief alle controles (met en zonder [REDACTED] protocol, met en zonder pro-inflammatoire cytokines, met en zonder maturatie en negatieve controle) zijn dit 7 condities. In totaal zijn hiervoor dus 6 dieren nodig per conditie dus **12** dieren in totaal.

Naast donoren voor het kweken van de [REDACTED] zijn ook donor dieren nodig om de effectiviteit van de [REDACTED] te analyseren op basis van [REDACTED] activatie en differentiatie. Hiervoor zullen we [REDACTED] muizen gebruikt worden. Uit eerdere experimenten is gebleken dat uit 1 donor muis ongeveer [REDACTED] [REDACTED] cellen geïsoleerd kunnen worden. Om het effect van [REDACTED] op de inductie van [REDACTED] cellen te onderzoeken zullen we [REDACTED] cellen samen kweken met [REDACTED] en vervolgens analyseren op oppervlakte markers, cytokines en expressie van transcriptie factoren. Op basis van eerdere experimenten weten we dat voor deze analyses ongeveer [REDACTED] cellen nodig zijn per conditie (= 3 donoren). Het aantal condities dat we willen testen zijn de 10 verschillende [REDACTED] kweek protocollen in aan- of afwezigheid van proinflammatoire cytokines (om ontsteking na te bootsen in vitro), in aanwezigheid van enkele [REDACTED] (om verschillende infecties na te bootsen) en in aanwezigheid van [REDACTED] [REDACTED] zoals dit ook bij humane [REDACTED] wordt gebruikt voordat de cellen ingespoten worden bij de patiënten<sup>(3,4)</sup>.

In totaal komt dit dus neer op 5 verschillende condities \* 10 [REDACTED] protocollen \* 3 [REDACTED] donoren = **150** [REDACTED] donor muizen.

Aantal dieren:

Opzet: 50

Analyse oppervlakte markers etc.:  $10 \times 5 \times 9 = 450$

[REDACTED] in vivo: 118 Microarray: 12 muizen

---

■ cel donoren:  $5 \cdot 10^3 = 150$  Totaal

aan tal dieren:

WT: 630 muizen

Tg: 150 muizen

---

---

### 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.

---

Door alle verschillende [REDACTED] kweekmethoden uit te testen in vitro en te kijken of de [REDACTED] onder deze condities [REDACTED] cellen kunnen induceren kunnen we het aantal verschillende [REDACTED] dat we in vivo zullen testen in modellen voor chronische ontsteking verminderen.

Het gebruik van een [REDACTED] cellijn is niet mogelijk. [REDACTED] cellijnen zijn zogenaamde 'end-stage' cellen en de bekende cellijnen ([REDACTED]) zijn allen representatief voor [REDACTED] zoals die in de milt van de muis gevonden niet representatief voor [REDACTED].

Voor de muis zijn bij ons geen [REDACTED] cellijnen bekend die kunnen differentiëren tot [REDACTED] cellen, omdat deze cellen niet naïef zijn. Het gebruik van [REDACTED] cel hybridoma's is ook niet wenselijk omdat we dan alleen [REDACTED] activatie kunnen analyseren en geen [REDACTED] [REDACTED].

In deze dierproef kiezen we muizen stammen die relevant zijn in het verdere onderzoek als ook het gebruik van [REDACTED] muizen om in meer detail het effect op [REDACTED] cel differentiatie te kunnen bekijken. Vanwege de complexiteit van de immuunrespons is het niet mogelijk dit te vervangen door bijvoorbeeld computer modellen. In alle gevallen zal eerst gedegen literatuur onderzoek gedaan worden om de meest veelbelovende [REDACTED] protocollen te selecteren.

---

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

---

Alle dieren zullen zonder voorafgaande handelingen gedood worden volgens de geldende richtlijnen. De dieren zullen in groepen worden gehuisvest conform geldende normen van huisvesting en kooiverrijking.

---

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

---



## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

Worden de dierproeven geheel of gedeeltelijk uitgevoerd bij een inrichting die niet onder de rechtstreekse verantwoordelijkheid van een instellingsvergunninghouder Wod valt? Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

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

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Er worden geen andere vormen van welzijnsaantasting voorzien.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn. n.v.t.

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

n.v.t.

### 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 van alle dieren in dit deel worden geclassificeerd als licht. Alle dieren gebruikt in deze dierproef worden zonder handelingen gedood en bij fok van [REDACTED] muizen die in deze bijlage beschreven zijn geen klinische verschijnselen bekend of beschreven.

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Het doden van de dieren is noodzakelijk om donor cellen te verzamelen voor het uitvoeren van de experimenten zoals beschreven

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.  | 10800                |   |
| 1.2 | Vul de naam van de instelling of organisatie in.                              | Universiteit Utrecht |   |
| 1.3 | Vul het volgnummer en het type dierproef in.                                  | Volgnummer           | Type dierproef  |
|     | <i>Gebruik de volgnummers van vraag 3.4.4 van het format Projectvoorstel.</i> | 2                    | █ therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten |

### 2 Beschrijving dierproeven

#### A. Experimentele aanpak en primaire uitkomstparameters

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

In dit deel van het project zal gekeken worden naar de effectiviteit van █ als gekweekt onder deel 1 in het onderdrukken van een chronische ontsteking met de nadruk op het therapeutisch effectiviteit. In de literatuur zijn meerdere experimenten beschreven waarin gekeken is naar het effect van █ therapie om chronisch ontstekingen voorkomen, maar nog weinig data is beschikbaar over het onderdrukken **tijdens** de ziekte. In dit deel zullen we kijken wat het ideale behandel protocol is van een chronisch ontsteking zoals artritis, met behulp van het proteoglycaan geïnduceerde artritis model<sup>0.a</sup>: █. Dit is een chronisch model waarbij het ziekte verloop intermitterend en relatief mild verloopt, vergelijkbaar als bij de mens. We hebben gekozen voor dit chronische model om juist het effect tijdens chronische ontsteking van █ therapie te onderzoeken. █

Tevens zullen we in dit model ook het mechanisme onderzoeken met behulp van █ muizen specifiek voor het ziekte inducerend antigeen, proteoglycaan. Door zowel de effector █ cellen (die de ziekte veroorzaken) als naïeve █ cellen te labelen met een zogeheten 'vital dye' kunnen we deze cellen terug vinden in het dieren en met behulp van o.a. FACS analyse bepalen hoe de cellen beïnvloed zijn door de tolDC therapie. Op deze manier kunnen we beoordelen of █ ook in vivo █ cellen antigeen specifiek kunnen █

Om █ cellen te induceren zullen we gebruik maken van peptiden die tolerantie kunnen induceren. Hierbij zullen we een proteoglycaan peptide gebruiken, waarvan bekend is dat het ziekte geïnduceerd tegen proteoglycaan kan voorkomen<sup>8</sup>. Maar ook een eerder door ons geïdentificeerd peptide █ kan antigeen specifieke regulerende █ celen induceren in het proteoglycaan geïnduceerde artritis muis model onafhankelijk van het ziekte inducerend antigeen █. De hypothese is dat dit peptide antigeen specifieke regulerende █ cellen induceert tegen verschillende

chronische ontstekingen. Initiële experimenten in transplantatie modellen in de muis laten inderdaad [ ] cel gemedieerde bescherming zien [ ]).

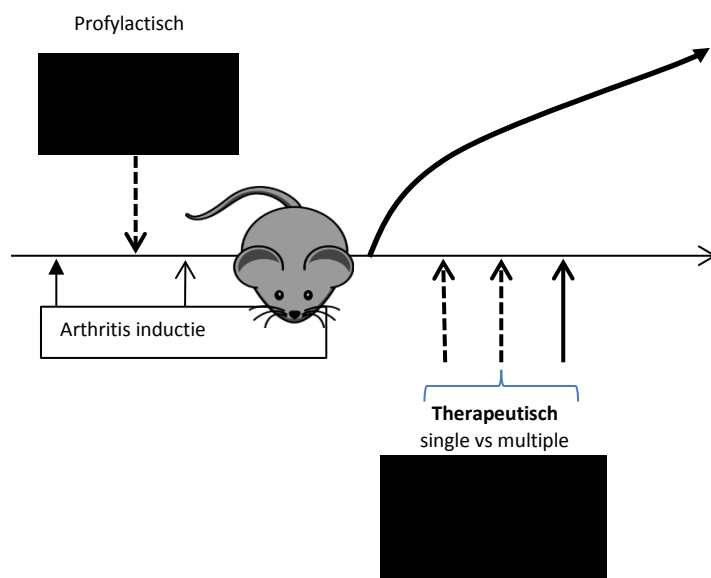
Juist dit aspect van [ ] therapie in combinatie met een peptide dat antigeen specifieke regulerende [ ] in verschillende chronische ontstekingsziekten zou van grote meerwaarde zijn voor het ontwikkelen van [ ] therapie voor humane patiënten. Om te onderzoeken of de hypothese correct is willen we 1 type [ ] in 1 dosering die effectief is gebleken in het artritis model testen in andere ontstekingen modellen. Aangezien artritis een overwegend Th1 type ontsteking is hebben we gekozen om een chronisch (auto-immuun) ontstekingen model te nemen met een ander type ontsteking, het dermatitis model. Dermatitis een meer gemengde Th2 ontsteking, door juist duidelijk verschillende typen ontsteking te kiezen kunnen deze experimenten de vraag beantwoorden of [ ] therapie voor meerdere chronische ontstekingen gebruikt kan worden in de toekomst. Als derde model willen we de mogelijke translatie naar de humane patiënt beter in kaart brengen en hiervoor hebben we gekozen voor een zogeheten [ ] model. In dit wordt gebruik gemaakt van een [ ] muis waarin [ ] immuuncellen worden [ ] om deze muis een [ ] immuunsysteem te geven en vervolgens te kijken naar een [ ] afstotingen. Ook in dit model is de ontsteking overwegend een Th1 type ontsteking. De [ ] therapie zal alleen in de laatste 2 genoemde modellen getest worden als blijkt dat deze effectief is in het onderdrukken van de ziekte in het artritis model.

In deel 2 zullen we de volgende vragen beantwoorden:

2a: Welke, dosis, frequentie, route, en timing van [ ] therapie is het meest efficiënt in het onderdrukken van chronisch ziekte. Als referentie zullen we een eenmalige profylactische (voor ziekte inductie) voor de toediening van [ ] nemen als vergelijking.

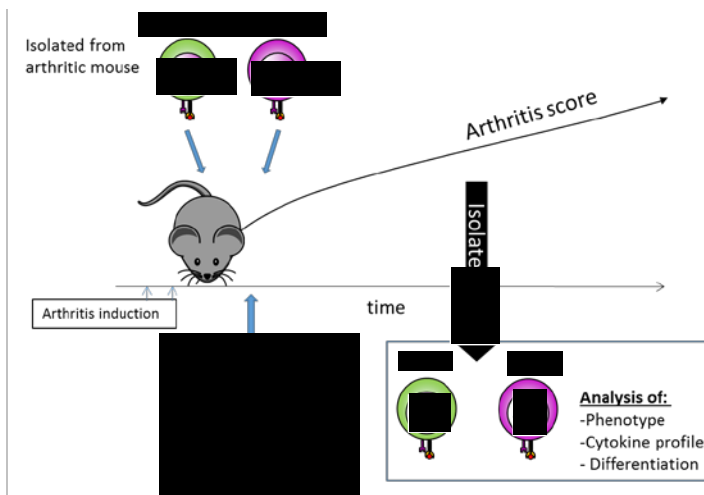
2b: Is [ ] therapie in staat om in vivo antigeen specifieke [ ] cellen te induceren en [ ] cellen te onderdrukken?

2c: werkt [ ] therapie ook in andere chronisch ontstekingsmodellen?



Figuur 1: [ ] worden op verschillende tijdstippen en in verschillende doses door gespoten.

Profylactisch zal slechts 1 dosis gekozen worden voordat de dieren ziekte ontwikkelen. Therapeutische toediening bij andere dieren zal starten zodra de eerste ziekte verschijnselen zichtbaar zijn, ongeveer een week na de 2<sup>e</sup> immunisatie. Vervolgens zal het effect op artritis verloop worden beoordeeld door de dieren meerdere keren per week te beoordelen op artritis verschijnselen.



Figuur 2: Artritis wordt geïnduceerd door 2 injecties met humaan proteoglycaan in met adjuvans DDA. Vervolgens worden [redacted] cellen uit verschillende muizen gelabeld met verschillende "Vital Dyes" en door gespoten net als de [redacted]. Door [redacted] cellen door te spuiten kan het effect op [redacted] cellen worden geanalyseerd en de [redacted] cellen geven een beeld van de [redacted] cellen.

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.

- Het artritis model:
- Proteoglycaan geïnduceerde artritis (PGIA) zal geïnduceerd worden met 2 injecties van proteoglycaan uit kraakbeen in DDA. Hiervoor zullen vrouwelijke dieren gebruikt worden op een balb/c achtergrond. Deze dieren hebben een hogere gevoeligheid voor het ontwikkelen van artritis waardoor een hogere incidentie wordt gehaald, minder injecties en minder dieren nodig zijn [redacted].
- De twee injecties worden i.p. toegediend met een tussen periode van 21 dagen. Vervolgens worden de dieren 2x per week bekeken op de ontwikkeling van artritis verschijnselen (roodheid en zwelling van de pootjes). Indien de dieren artritis krijgen wordt het klinisch onderzoek geïntensiveerd afhankelijk van de ernst van het verloop.
- Tijdens artritis zal bloed afgenomen worden doormiddel van een wang prik, waarbij maximaal 100 ul er muis wordt afgenomen en maximaal 1 x per 3 weken.

Dieren die behandeld worden met [redacted] therapie zullen tussen de 1 en maximaal 5 injecties krijgen afhankelijk van welke experimentele groep de dieren zitten. Deze injecties met tussen de [redacted] en [redacted] zullen i.v., i.p., s.c. / [redacted] (zoals bij de mens in de recente fase I trial van [redacted] gegeven worden. Voor profylactische controle behandeling zullen dieren eenmalig ongeveer [redacted] krijgen vlak voor de 2<sup>e</sup> immunisatie voor artritis inductie.

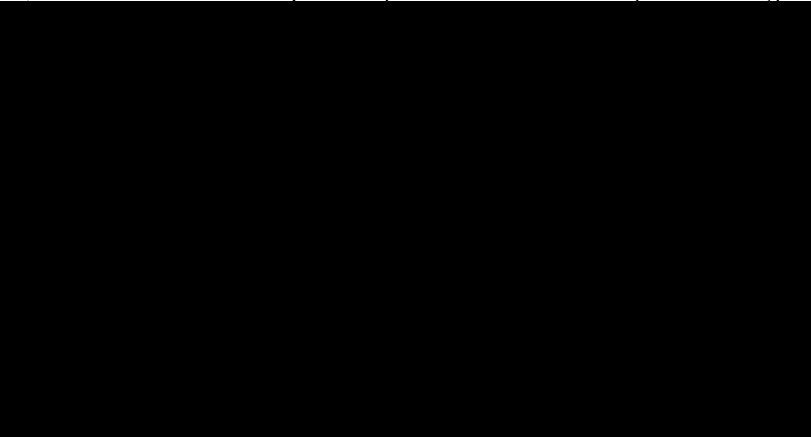
Dieren uit deel 2b waarbij het effect op [redacted] cellen wordt bekeken zullen een dag voor de [redacted] therapie [redacted] cellen gelabeld met een vital dye i.v. krijgen toegediend. In deze experimenten zullen alleen effectieve routes en een eenmalige toediening van [redacted] gebruikt worden.

In het laatste deel zal gekeken worden naar de effectiviteit van [redacted] therapie in andere modellen voor chronische ontsteking. Hierbij zal 1 dosis [redacted] gekozen worden die effectief was in artritis (deel 2a) en met een zo laag mogelijk frequentie van doorspuiten. Ook in de andere modellen van chronische ontsteking zal het ziekte verloop op meerdere dagen per week worden vervolgd (minimaal 2x per week).

De andere modellen voor chronische ontsteking waar mee gewerkt zal worden zijn een gehumaniseerd transplantatie model en atopische dermatitis.

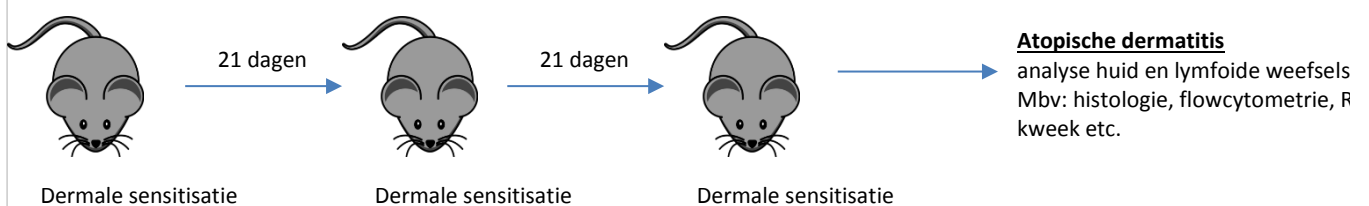
Het [redacted] model wordt uitgevoerd in samenwerking met de universiteit Nijmegen waar het

model ontwikkeld is. In dit model wordt humane huid getransplanteerd op een immunodeficiënte muis onder narcose. Na 3 weken als de graft geaccepteerd is worden humane [ ] cellen doorgespoten en op dat moment zal ontsteking ontstaan in het transplantaat. Vervolgens zal de therapie worden ingezet door [ ] door te spuiten (in dit geval natuurlijk [ ]). Deze dieren worden vervolgens regelmatig (tot zelfs dagelijks) beoordeeld op afstoting van de huid. Na 3 weken zal de huid en de lymfoïde organen van de dieren geïsoleerd worden en beoordeeld op ontsteking, infiltraat en [ ] zoals te meten aan cytokine productie en transcriptie factor gebruik.



Figuur 3: Schematische weergave van het [ ] model. [ ] huid wordt onder narcose getransplanteerd op een [ ] muis. Na 3 weken is de huid graft geaccepteerd en wordt een [ ] immuunsysteem in de muis gebracht door het inspuiten van allergenen perifere bloed cellen van een bloeddonor. Gedurende 3 weken wordt gekeken naar het ontwikkelen van ontsteking. Na 3 weken worden de graft en de lymfoïde organen geïsoleerd en de huidontsteking en immunerespons geanalyseerd met behulp van flowcytometrie en histologie<sup>15</sup>

Het tweede model is een dermatitis model, hiervoor is gekozen omdat het hier een gemengde Th2/Th1 gemedieerde response betreft en bij artritis of transplantatie met name een Th1/Th17 response en dit zal laten zien of [ ] therapie breed inzetbaar is bij een disbalans van het immuunsysteem. In dit model wordt de ziekte geïnduceerd met 2 tot 3 dermale sensitisaties met het allergeen in adjuvans met 3 weken tussen tijd. Na afloop wordt de huid geanalyseerd op infiltratie van ontstekingscellen en worden de lymfoïde organen geïsoleerd om de inductie van [ ] cellen te analyseren tegen het allergeen met o.a. kweek en flowcytometrie<sup>16</sup>. De [ ] therapie zal worden toegediend tussen de 2<sup>e</sup> en de 3<sup>e</sup>.



Figuur 4: schematische weergave van het dermatitis model. Muizen worden geschoren onder anesthesie en dermaal gesensitiseerd. Sensitisatie wordt 3 maal herhaald met tussenpozen van 3 weken en vervolgens worden huid en lymfoïde organen gesoleerd voor analyse op ontwikkelen van [ ] celen en huidontsteking.

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

Er is overwogen hoeveel dieren er nodig zijn om een aan te tonen effect te bewijzen (true difference of the means). De calculatie van de hoeveelheid dieren is gedaan met de software behandeld in de proefdiercursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). De aannames en vergelijkingen zijn onder **B** nader

toegelicht.

## B. De dieren

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

In dit deel van het project zal gebruik gemaakt worden van muizen afkomstig van commerciële proefdierleveranciers of vanuit eigen fok indien het specifieke transgene muizen betreft. In alle gevallen zullen volwassen dieren van beide sexen gebruikt worden waarbij in het algemeen dieren tussen de 6-12 weken aangekocht zullen worden, omdat in deze dieren het immuunsysteem volledig ontwikkeld is. Alleen in het geval van artritis inductie zal gekozen worden voor muizen van meer dan >16 weken oud en bij voorkeur gepensioneerde fokvrouwen, omdat deze de hoogste gevoeligheid hebben voor het ontwikkelen van artritis<sup>18</sup>.

### Aantallen deel 2a:

In dit deel willen we maximaal 3 verschillende doses, maximaal 3 verschillende frequenties (1x, 3x of 5x), meerdere routes (maximaal 3) testen als therapeutische mogelijkheden en dat vergelijken met een enkele profylactische dosis. Er is gekozen voor verschillende doses en verschillende frequentie om te kijken of hoger of herhaaldelijk doseren de effectiviteit kan verhogen. In de literatuur zijn meerdere routes beschreven voor het toedienen van celtherapie, het is echter nog niet bekend of het effect van celtherapie afhankelijk is van de route van toedienen.

Hierbij willen we 2 typen [redacted] die in bijlage 1 effectief [redacted] cellen induceerde in vitro testen op effectiviteit om in vivo [redacted] cellen te induceren en chronische ontsteking te onderdrukken.

Om de effectiviteit te bepalen worden [redacted] vergeleken met conventionele immature [redacted] in aan- en afwezigheid van het ziekte inducerend antigeen (proteoglycaan) of een anti-inflammatoir antigeen ([redacted]).

Om tolDCs te matureren en stabiliseren wordt in de literatuur gebruik gemaakt van een non-toxisch [redacted], ter controle zullen de tolDCs ook behandeld worden met dit humaan [redacted] ligand, hiermee beantwoorden we de vraag of dit inderdaad de effectiviteit en stabiliteit in vivo verhoogd..

### Groepen:

1. conventionele [redacted] met antigeen
2. conventionele [redacted] zonder antigeen
3. [redacted] 1 met antigeen
4. [redacted] 2 met antigeen
5. [redacted] 1 met [redacted] en antigeen
6. [redacted] en antigeen

Per toedieningsroute zullen deze 6 testgroepen met elkaar vergeleken worden. In dit geval is groep 1 de referentie populatie die beschreven is als effectieve profylactische toediening van immature conventionele [redacted] en groep 2 een negatieve controle.

In totaal zijn dit dus  $3 \times 3 \times 3 = 27$  therapie verschillende manieren van toedienen voor de 6 test groepen. In de analyse willen we groep 3 statistisch vergelijken met groep 1,2 en 5 en groep 4 met groep 1,2 en 6. Op deze manier analyseren we het effect van 2 [redacted] groepen afzonderlijk en niet direct met elkaar op deze manier zijn minder dieren nodig per analyse. De vergelijking tussen de groepen op basis van effectiviteit om [redacted] cellen te induceren zal in deel 2b bepaald worden.

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaarddeviatie (sigma, tweezijdig) in artritis score van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Omdat we 3 vergelijkingen willen maken hebben we een Bonferoni correctie toegepast op de alfa, waardoor we een alfa van 0.017 verkrijgen. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 11 dieren nodig hebben.

In totaal zou dat voor dit deel  $11 \times 6 \times 27 = 1782$  acceptor muizen

### Aantallen deel 2b:

In dit deel willen we de effectiviteit van de in bijlage 1 geselecteerde [redacted] beoordelen om in vivo



██████████ tijdens ziekte.  
Hier kiezen we voor een eenmalige toediening van de ██████████ met zekerheid vast te kunnen stellen. Na transfer van ██████████ cellen zullen maximaal 2 routes van ██████████ worden geanalyseerd en zal de ██████████ injectie op maximaal 3 verschillende tijdstippen gegeven worden. De keuze voor de routes zal gemaakt worden op basis van de resultaten uit deel 2a, hierbij zullen 2 effectieve routes geselecteerd worden. De verschillende tijdstippen zijn om te kijken of ██████████ wanneer deze vroeg in het ziekte verloop wordt gegeven ten opzichte van op latere tijdstippen. Het is de hypothese dat vroeg behandelen van patiënten net na ontwikkelen van de ziekte effectiever is dan later, deze hypothese kunnen we in dit experiment testen.  
De derde vraag die we in dit deel willen beantwoorden is of een ziekte inducerend antigeen vergelijkbare ██████████ en we zullen deze direct met elkaar vergelijken.

Test groepen:

1. Conventionele ██████████ met antigeen 1
2. Conventionele ██████████ met antigeen 2
3. conventionele ██████████ zonder antigeen (negatieve controle)
4. ██████████ 1 met antigeen 1
5. ██████████ 1 met antigeen 2
6. ██████████ 2 met antigeen 1
7. ██████████ met antigeen 2
8. ██████████ met ██████████ en antigeen
9. ██████████ met ██████████ en antigeen

In totaal hebben we hier dus 9 testgroepen, waarbij we 2 routes vergelijken en 3 tijdstippen van ██████████ therapie. Voor het bepalen van de groepsgrootte gelden dezelfde aannames als in het vorige deel, met als verschil dat we in dit experiment meerdere vergelijkingen hebben. Hier willen we zowel de ██████████ als de ██████████ met elkaar vergelijken en betreft het 5 vergelijkingen, bijvoorbeeld groep 4 vergelijken we met groep 1,3,5,6 en 8. En groep 6 vergelijken we met groep 2,3,4,7 en 9.

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaarddeviatie (sigma, tweezijdig) in arthritis score van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Omdat we 5 vergelijkingen willen maken hebben we een Bonferoni correctie toegepast op de alfa, waardoor we een alfa van 0.01 verkrijgen. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 12 dieren nodig hebben.

Dit geeft dus  $12 \cdot 9 \cdot 2 \cdot 3 = 648$  acceptor dieren

Deze dieren ontvangen ook ██████████ therapie. Hiervoor zullen we ██████████ muizen gebruikt worden. Uit eerdere experimenten is gebleken dat uit 1 donor muis ongeveer ██████████ cellen geïsoleerd kunnen worden. Dus om ██████████ cellen te kunnen doorspuiten hebben we 2 donor muizen nog. Dit geeft dus  $648 \cdot 2 = 1296$  donor dieren die gedood worden zonder voorafgaande handelingen.

Aantallen voor deel 2c:

In dit deel willen we aantonen dat ██████████ therapie ook effectief is in andere chronische ontstekingen waar een ander type ontsteking aan ten grondslag ligt. In dit geval is gekozen voor een atopische dermatitis model omdat dit een meer Th2/Th1 type ontsteking is en arthritis een Th17/Th1 type.

Groepen:

1. Conventionele ██████████ met antigeen
2. conventionele ██████████ zonder antigeen
3. ██████████ met antigeen
4. ██████████ met antigeen
5. ██████████ 1 met ██████████ en antigeen
6. ██████████ 2 ██████████ en antigeen

In dit deel zullen we slechts 2 therapie schema's testen die effectief [redacted] in het artritis model. In het dermatitis model gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) in ziekte score van minimaal 25%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. Omdat we 3 vergelijkingen willen maken hebben we een Bonferoni correctie toegepast op de alfa, waardoor we een alfa van 0.017 verkrijgen. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 8 dieren nodig hebben.

In totaal betreft het dan  $8 \times 6 \times 2 = 96$  dieren

Om een translationele stap te kunnen maken is het essentieel om aan te tonen dat [redacted] therapie ook in het humane immuunsysteem in staat is [redacted] cellen te induceren. Hiertoe willen we gebruik maken van een muis transplantatie model, waarbij in immuundeficiënte muizen humane immuun cellen worden ingespoten samen met de [redacted] injectie.

Voor het humane transplantatie model is bekend dat de variatie rond de 20% ligt, de power wordt gesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen en het at te tonen verschil houden we op 50%. Bij een alfa van 0.017 door de bonferoni correctie, geeft dit een groeps grootte van 7 dieren per groep.

Groepen:

1. Conventionele [redacted] met antigeen
2. Geen celtherapie
3. [redacted] 1 met antigeen
4. [redacted] 2 met antigeen
5. [redacted] met [redacted] en antigeen
6. [redacted] 2 [redacted] en antigeen

In deze proeven willen we de therapie van [redacted] vergelijken met ongeladen DCs en een negatieve controle groep zonder therapie.

Omdat het hier experimenten betreft die afhankelijk zijn van humane donoren speelt ook donor variatie mee in de uitkomst van het experiment. Om eventuele donor variatie te kunnen beoordelen zal het experiment 3 maal uitgevoerd worden met 3 afzonderlijke donoren.

In totaal betreft het dan  $6 \times 7 \times 3 = 126$  muizen

In totaal voor deel 2:

Donor dieren: 1296

Artritis dieren:  $1782 + 648 = 2430$

Overige ontstekingsmodellen:  $96 + 126 = 222$

Totaal: **3948**

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

Indien surplus dieren beschikbaar zijn van de juiste leeftijd en achtergrond is hergebruik van dieren te overwegen. Het is echter van belang dat dieren niet eerder zijn gebruikt voor studies waarbij het immuunsysteem gemanipuleerd is omdat dit de uitkomst kan beïnvloeden

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 vraagstelling vereist de bestudering van de immuunrespons in vivo, namelijk kunnen [REDACTED] in vivo [REDACTED] regulatoire [REDACTED] cellen [REDACTED]? Kunnen deze Tregs artritis onderdrukken? Wat is de meest effectieve therapie voor wat betreft dosering, frequentie van toediening of de timing tijdens het ziekte verloop voor een [REDACTED] therapie? Vanwege de complexiteit van de immuunrespons is het niet mogelijk dit te vervangen door bijvoorbeeld computer modellen. Waar mogelijk worden wel eerst in vitro experimenten uitgevoerd voordat er wordt getest in muizen en met materiaal afkomstig uit deze dieren worden in vitro tests gedaan om zo de resultaten beter te kunnen interpreteren. Dit is gebaseerd op experimenten beschreven in de literatuur en ervaring binnen onze groep met diermodellen en de te analyseren parameters.

In het laatste deel wordt alleen gekeken naar het effect van op dat moment reeds bewezen therapeutisch toepassing van [REDACTED] in diermodellen voor chronische ontsteking waarmee ervaring is op gedaan door partners waarmee direct wordt samengewerkt of ervaring mee is binnen de eigen onderzoeksgroep.

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

Alle dieren worden minimaal één keer in de week gecontroleerd zodat het ongerief tot het minimum beperkt blijft. De muizen waarbij artritis geïnduceerd is krijgen extra voer in de kooi zodat deze muizen niet per se op hun achterpoten hoeven staan om erbij te kunnen. Bij de andere muizen is de standaard kooiverrijking aanwezig.

### Herhaling en duplicering

#### E. Herhaling

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

### Huisvesting en verzorging

#### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

#### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Nee > Ga verder met vraag H.

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

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

## Ongeriefinschatting/humane eindpunten

### H. Pijn en pijnbestrijding

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

Nee > Ga verder met vraag I.

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

Nee > Motiveer dan waarom geen pijnverlichtingsmethoden worden toegepast.

Artritis inductie en de ontwikkeling van ontsteking bij dermatitis en transplantatie geven ongerief bij de dieren. Echter het toepassen van pijnstillers bij deze dieren zal het immuunsysteem beïnvloeden<sup>19</sup>. Het is bekend dat NSAIDs de ontstekingsreactie direct beïnvloeden en daarmee het ziekte model nadelig beïnvloeden. Maar ook het gebruik van opioïden kan de immunoreactie beïnvloeden. Buprenorfine wordt vaak beschreven als een veilig alternatief met weinig effect op het immuunsysteem, echter ook buprenorfine kan de inductie van artritis nadelig beïnvloeden in sommige modellen, aangezien voor de modellen die gebruikt worden in deze aanvraag het effect van buprenorfine niet voldoende onderzocht is zal dit niet worden toegepast. Aangezien immunologische parameters bepalen zijn voor de uitkomsten van het onderzoek is het in deze dieren net mogelijk pijnstilling toe te passen.

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

In het geval van het transplantatie model zal het transplanteren van de huid onder algehele anaesthesie plaatsvinden met passende analgesie.  
In het dermatitis model zullen de dieren onder gas anesthesie worden geschoren en gesensitiseerd.

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

1. Het ontwikkelen van dermatitis en transplantatie reactie zal aanleiding zijn voor het ontwikkelen van ongerief. Het ontwikkelen van anafylactische reacties in het dermatitis model zijn niet beschreven.
2. Handeling van de dieren meerdere malen per week ten behoeven van artritis score.

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Ontsteking van de huid geeft irritatie en mogelijk jeuk.
2. Handeling geeft stress, echter het mogelijk ongerief van de artritis maakt vaker hanteren van de dieren noodzakelijk

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.

Voor de artritis score geldt een maximum score van 16 per dier. Ieder poot kan een score van 4 punten halen. Score 1 matige roodheid en zwelling aan 1 teen of de poot. Score 2 roodheid en zwelling aan de poot of aan maximaal 2 tenen. Score 3: roodheid en zwelling aan de poot en maximaal 3 tenen of milde zwelling van de poot en maximaal 4 tenen. Score 4: roodheid en zwelling aan zowel de poot als 4 tenen. Een score van 12 wordt beschouwd als een humaan eindpunt.

Voor het transplantatie model wordt als huumaan eindpunt necrose ten gevolge van afstoting van het transplantaat aangehouden.

Voor het dermatitis model wordt gekeken naar het ontwikkelen van dermatitis, duidelijke jeuk (continue krabben) en het openkrabben van de huid worden aangehouden als humaan eindpunt. Het dermatitis model is een progressief model en bij het ontwikkelen van jeuk zal deze niet verdwijnen, om de ontwikkeling van

mogelijke secundaire infecties ten gevolge van krablaesies aan de huid te voorkomen beschouwen we de ontwikkeling van chronische jeuk als HEP.

Naast model specifieke humane eindpunten wordt ook gekeken naar algemeen welbevinden van de dieren, op basis duidelijke veranderingen in uiterlijk, gewicht of gedrag zullen de dieren worden geuthenaseerd. Hierbij wordt gelet op bol zitten, roodheid rond de ogen en lusteloosheid voor een periode van > 24 uur wordt beschouwd als humaan eindpunt. In het geval van een indicatie van gewichtsverlies worden de dieren gewogen en bij >15% gewichtsverlies in 2 dagen is het HEP bereikt.

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

In het geval van artritis en transplantatie is het te verwachten aantal dieren dat het HEP bereikt ongeveer 10%

In het geval van dermatitis is het ontwikkelen van de ziekte gelijk aan het bereiken van het HEP in dit geval zal tussen de 25 en maximaal 70% van de dieren het HEP bereiken (afhankelijk van de effectiviteit van de therapie).

Voor donor dieren is niet te verwachten dat het HEP bereikt wordt.

### 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.

Donor dieren: licht ongerief

Het ongerief van de experimentele dieren is afhankelijk van de effectiviteit van de therapie. Voor de inschatting gaan we ervan uit dat slechts de helft van de therapie effectief zal zijn om zo het ongerief niet te onderschatten.

Artritis model: 25% licht, 75% van de dieren zullen tot maximaal matig ongerief hebben

Dermatitis model: 56% licht ongerief en in maximaal 44% van de dieren tot matig ongerief

Transplantatie model: 40% licht ongerief en 60% tot matig ongerief

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Na afloop van het experiment worden de immuun relevante organen geïsoleerd uit de dieren voor verder analyses.

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).

Vul uw deelnemernummer van de NVWA in.

10800

Vul de naam van de instelling of organisatie in.

Universiteit Utrecht

Vul het volgnummer en het type dierproef in.

Volgnummer

Type dierproef

3

Ontwikkelen van een [redacted] vaccin voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten.

*Gebruik de volgnummers*

#### 1 Algemene gegevens

1.1

1.2

1.3

*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.

In dit deel van het project zal gekeken worden naar de effectiviteit van een therapeutisch vaccin bij chronische ziekten. In dit deel zullen de initiële experimenten ook weer gedaan worden in het proteoglycaan geïnduceerde artritis model waarmee veel ervaring is (een typisch Th17/Th1 model) en zal in het vervolg ook gekeken worden naar de effectiviteit van een dergelijk [redacted] vaccin in een model voor dermatitis (een typisch Th2/Th1 model).

Om [redacted] cellen te induceren zijn verschillende methoden beschreven in de literatuur. Zo is het mucosaal immuunsysteem bekend om zijn [redacted] capaciteit in een profylactische setting. Recent zijn er meerdere aanwijzingen in de literatuur beschreven dat ook dermale toediening een goede

route is om [redacted] cellen te krijgen. In dit deel van het project willen we ons voornamelijk richten op of we via de meest veelbelovende routes [redacted] cellen kunnen induceren tijdens de aanwezigheid van een ontsteking, zoals bijvoorbeeld artritis of dermatitis. Door gebruik te maken van een [redacted] cel transfer model kunnen we het effect van de vaccinatie op [redacted] differentiatie in detail volgen. Daarnaast zullen we gebruik [redacted] Dit [redacted]

In deel 3 zullen we de volgende vragen beantwoorden:

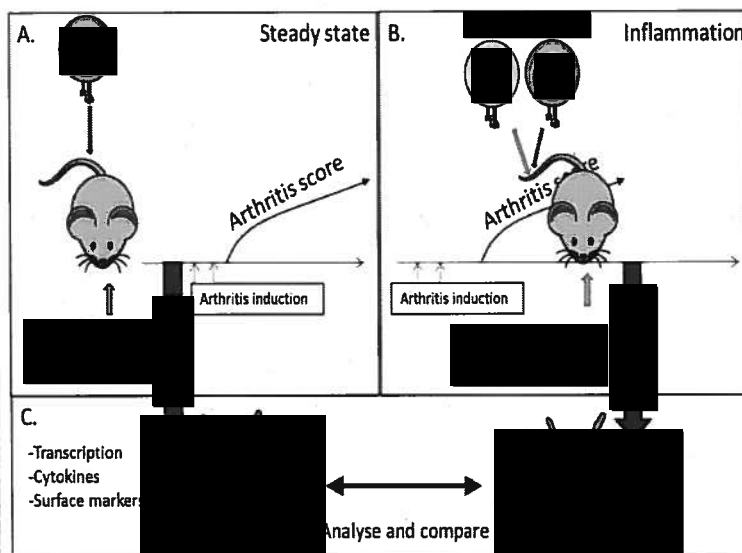
3a: is het mogelijk een chronische ontsteking te onderdrukken met een [redacted] Om deze vraag te beantwoorden zullen we verschillende adjuvantia testen. In ieder geval zullen we verschillende [redacted] onderzoeken omdat we eerder hebben aangetoond dat bijvoorbeeld PLGA nano-partikles tolerogene markers opreguleren in vitro in [redacted]. Maar ook [redacted] liganden en [redacted] liganden worden in de literatuur aangewezen als potentiële [redacted]

adjuvantia<sup>14</sup>.

Om het effect van de [redacted] vaccinatie in vivo te beoordelen zullen we hierbij gebruik maken van adoptieve transfer modellen waarin we [redacted] cellen gelabeld met een vita dye doorspuiten en aan het eind van het experiment hun differentiatie en lokalisatie de muis kunnen beoordelen met behulp van FACS analyse.

De dieren zullen voor het ontwikkelen van ziekte gevaccineerd worden om de steady state vaccinatie te beoordelen en na induceren van de ziekte ( na de laatste immunisatie) om de therapeutische effectiviteit vast te stellen.

3b. De andere belangrijke vraag die wil in dit deel van het project willen beantwoorden is wat is er anders is [redacted] In veel modellen is het goed mogelijk een [redacted] vaccinatie toe te passen door bijvoorbeeld gebruik te maken van [redacted] inductie. Echter tijdens ontsteking is dit veel minder effectief. Om deze verschillen in kaart te brengen willen we kijken welke [redacted] een rol spelen tijdens [redacted] inductie door een [redacted] vaccinatie te geven in conditionele knock-out muizen waarin we specifieke [redacted] kunnen uitschakelen met behulp van [redacted] Daarnaast zullen we [redacted] isoleren na vaccinatie uit de drainerende lymfeknopen en deze vergelijken tussen dieren met een chronische ziekte en dieren zonder een chronische ontstekingsziekte.



Figuur 1:

Therapeutische en profylactische vaccinatie wordt vergeleken met de focus op [redacted] en [redacted] vaccinatie routes. Hierbij wordt het type [redacted] dat betrokken is bij de inductie in kaart gebracht met behulp van specifiek transgene muizen, maar ook door [redacted] te isoleren uit de drainerende lymfeklieren.

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.

- **Het artritis model:**

- Proteoglycaan geïnduceerde artritis (PGIA) zal geïnduceerd worden met 2 injecties van proteoglycaan uit kraakbeen in DDA. Hiervoor zullen vrouwelijke dieren gebruikt worden op een balb/c achtergrond. Deze dieren hebben een hogere gevoeligheid voor het ontwikkelen van artritis waardoor een hogere incidentie wordt gehaald, minder injecties en minder dieren nodig zijn<sup>18</sup>.
- De twee injecties worden i.p. toegediend met een tussen periode van 21 dagen. Vervolgens worden de dieren 2x per week bekeken op de ontwikkeling van artritis verschijnselen (roodheid en zwelling van de pootjes). Indien de dieren artritis krijgen wordt het klinisch onderzoek geïntensiveerd afhankelijk van de ernst van het verloop.
- Tijdens artritis zal bloed afgenomen worden doormiddel van een wang prik, waarbij maximaal 100 ul er muis wordt afgenomen en maximaal 1 x per 3 weken.
- Dieren waarbij het effect op T-cellen wordt bekeken zullen een minimaal dag voor toediening van het vaccin T-cellen gelabeld met een vital dye i.v. krijgen toegediend.
- T-cellen vaccinatie met ziekte inducerend antigeen (proteoglycaan) of in aanwezigheid van een tolerogeen adjuvant zal voor of na de 2<sup>e</sup> vaccinatie plaatsvinden om het onderscheid te maken tussen vaccinatie in de steady state en tijdens ontsteking.
- Het tweede model is een **dermatitis model**, hiervoor is gekozen omdat het hier een voornamelijk Th2 gemedieerde response betreft anders dan bij artritis dit zal laten zien of vaccinatie breed inzetbaar is bij een disbalans van het immuunsysteem. In dit model wordt de ziekte geïnduceerd met 2 of 3 sensitisatie met allergeen met 3 weken tussen tijd gevolgd door een challenge op de huid. De sensitisatie wordt of afhankelijk van het antigeen. Vervolgens worden de dieren gechallenged en wordt de ontwikkeling van huidontsteking op de plek van de challenge visueel beoordeeld. Alle dieren zullen aan het eind van het experiment gedood worden om de immuun relevante organen te isoleren voor verdere analyse in het laboratorium.
- T-cellen vaccinatie met ziekte inducerend antigeen of eiwit in aanwezigheid van een adjuvant zal voor of na de 2<sup>e</sup>/3<sup>e</sup> vaccinatie plaatsvinden om het onderscheid te maken tussen vaccinatie in de steady state en tijdens ontsteking.

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

Er is overwogen hoeveel dieren er nodig zijn om een aan te tonen effect te bewijzen (true difference of the means). De calculatie van de hoeveelheid dieren is gedaan met de software behandeld in de proefdiercursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>). De exacte afwegingen en statistische berekeningen zijn hieronder verder uitgewerkt.

## B. De dieren

Benoem de diersoorten, herkomst, geschatte aantallen en levensstadia. Onderbouw deze keuzes. In dit deel van het project zal gebruik gemaakt worden van muizen afkomstig van commerciële proefdier leveranciers of vanuit eigen fok indien het specifieke transgene muizen betreft. In alle gevallen zullen volwassen dieren gebruikt worden waarbij in het algemeen dieren tussen de 6-12 weken aangekocht zullen worden, omdat in deze dieren het immuunsysteem volledig ontwikkeld is. Alleen in het geval van artritis inductie zal gekozen worden voor muizen van meer dan >16 weken oud en bij voorkeur gepensioneerde fokvrouwen, omdat deze de hoogste gevoeligheid hebben voor het ontwikkelen van artritis. In het geval van dermatitis is er geen geslachtsvoorkeur voor de dieren.

### Aantallen deel 2a:

In totaal kunnen naar verwachting maximaal 10 verschillende adjuvantia testen. Enkele voorbeelden zijn PLGA partikels (mogelijk geladen met , anti-inflammatoire compounds als , liposomale formuleringen, anti-lichaam gemedieerde targeting van . Hierbij willen we gebruik maken van 2 peptiden. Ten eerste het aangetoond dat het regulerende T cellen kan induceren in artritis en een tweede ziekte relevant peptide (bijvoorbeeld proteoglycaan peptide in artritis of ovalbumine in dermatitis). Om de effectiviteit van het vaccin te testen zullen we maximaal 3 verschillende doseringen testen per verschillend adjuvans. Het aantal doseringen is afhankelijk van de formulering van het vaccin en de concentratie peptide die hierin beschikbaar is voor het immuunsysteem en meetbare cel activatie geeft van de ingespoten T-cellen.

Per experiment hebben we een positieve controle nodig met een bekend stof



(bijvoorbeeld dexamethason) en een onbehandelde negatieve controle en kunnen we in totaal 5 testgroepen analyseren (met 2 controles erbij zijn dat 7 groepen per experiment).

**Groepen:**

- Groep 1: positieve controle
- Groep 2; negatieve controle
- Groep 3: test vaccin 1 dosis 1
- Groep 4: test vaccin 1 dosis 2
- Groep 5: test vaccin 1 dosis 3

**Artritis model:**

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) van artritis hebben tussen de experimentele groepen van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. We vergelijken alle behandelingen met de negatieve controle en hebben dus 4 vergelijkingen. Door het toepassen van de Bonferoni correctie op de alfa, hebben we een alfa van 0.0125. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 12 dieren nodig hebben.

In totaal dus 10 vaccins \* 5 groepen\* 12 dieren= **600** muizen).

Omdat we in deze dieren ook de [redacted] cel response willen vervolgd hebben maximaal **1200** donor muizen nodig, aangezien we 2 donor muizen nodig hebben om voldoende [redacted] cellen uit te isoleren voor een transfer (zie bijlage 2).

**Dermatitis model:**

Voor het dermatitis model gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) van artritis hebben tussen de experimentele groepen van minimaal 25%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. We vergelijken alle behandelingen met de negatieve controle en hebben dus 4 vergelijkingen. Door het toepassen van de Bonferoni correctie op de alfa, hebben we een alfa van 0.0125. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 12 dieren nodig hebben.

In totaal dus 10 vaccins \* 5 groepen\* 9 dieren= **450** muizen).

Omdat we in deze dieren ook de [redacted] cel response willen vervolgd hebben maximaal **900** donor muizen nodig, aangezien we 2 donor muizen nodig hebben om voldoende [redacted] cellen uit te isoleren voor een transfer (zie bijlage 2).

**Aantallen deel 3b:**

In deel 3b zullen we ons richten op de [redacted] cel. In dit deel zullen we [redacted] isoleren uit dieren die een chronische ontsteking en controle dieren kort na vaccinatie om de verschillen tussen deze [redacted] in kaart te brengen. In deze vraagstelling is het niet noodzakelijk om verschillende diermodellen met verschillende ontstekingen te testen en beperken we ons tot het artritis model.

Hier willen we 2 effectieve vaccins testen (getest in 3a) via beide routes [redacted]. Hierbij zullen de lymfeknopen geïsoleerd worden op 3 tijdstippen na vaccinatie om te analyseren of de [redacted] veranderen over tijd na vaccinatie.

**Groepen per experiment:**

- Groep 1: positieve controle
- Groep 2: negatieve controle
- Groep 3: vaccin1 [redacted]
- Groep 4: vaccin 1 [redacted]

**Artritis model:**

Door ervaring uit eerdere experimenten gaan we uit van een standaard deviatie (sigma, tweezijdig) van artritis hebben tussen de experimentele groepen van minimaal 30%. De power wordt vastgesteld op 90% om de kans op een type II fout te verkleinen, dit gezien de variatie. Het aan te tonen effect (true difference of means) tussen de testgroepen wat we willen bereiken is 50%. We vergelijken alle behandelingen met de negatieve controle en hebben dus 3 vergelijkingen. Door het toepassen van de Bonferoni correctie op de alfa, hebben we een alfa van 0.017. Wanneer we deze gegevens invullen in de software behandeld in de

proefdierkunde cursus (<http://www.stat.uiowa.edu/~rlenth/Power/>) geeft dit dat we per analyse 11 dieren nodig hebben.

- Dit zijn dus **44** dieren per experiment.
- Per vaccin wordt dit experiment **6** maal uitgevoerd, namelijk de dieren worden op 3 tijdstippen na vaccinatie geanalyseerd en zowel tijdens steady state als tijdens een ontsteking.
- We willen 2 succesvolle (in 3a) vaccinaties testen

In totaal dus 2 vaccins \* 6 experimenten \* 44 dieren = **528** muizen).

En tevens zullen we 2 effectieve vaccin routes [redacted] en 2 effectieve formuleringen (bewezen in 3a) testen, samen met de juiste positieve (immunosuppressivum) als negatieve (ongevaccineerde) controle in zowel conventionele als conditionele knock-out muizen (2 stammen). In totaal zijn dit dus 6 groepen per stam dus 18 groepen van 12 dieren in totaal **216** dieren

In totaal voor deel 2:

Donor dieren: 2100

Artritis/dermatitis met vaccinatie: 600+450+528+216=1794

Totaal: **3894**

### C. Hergebruik

Is er hergebruik van dieren?

Nee, ga door met vraag D.

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

Indien surplus dieren beschikbaar zijn van de juiste leeftijd en achtergrond is hergebruik van dieren te overwegen. Het is echter van belang dat dieren niet eerder zijn gebruikt voor studies waarbij het immuunsysteem gemanipuleerd is omdat dit de uitkomst kan beïnvloeden

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 vraagstelling vereist de bestudering van de immuunrespons in vivo, namelijk kunnen [redacted] in vivo [redacted] regulatoire [redacted] cellen ([redacted] [redacted]) Kunnen deze Tregs artritis onderdrukken? Via welke route is het mogelijk therapeutisch te vaccineren voor regulerende T cellen en in aanwezigheid van welke tolerogene adjuvans? Vanwege de complexiteit van de immuunrespons is het niet mogelijk dit te vervangen door bijvoorbeeld computer modellen. Waar mogelijk worden wel eerst in vitro experimenten uitgevoerd voordat er wordt getest in muizen en met materiaal afkomstig uit deze dieren worden in vitro tests gedaan om zo de resultaten beter te kunnen interpreteren. Dit is gebaseerd op experimenten beschreven in de literatuur en ervaring binnen onze groep met diermodellen en de te analyseren parameters.

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 muizen waarbij artritis geïnduceerd is wordt er extra op gelet dat deze muizen extra voer in de kooi hebben liggen zodat ze niet per se op hun achterpoten hoeven staan om erbij te kunnen. Verder worden de muizen regelmatig gecheckt zodat het ongerief tot het minimum beperkt blijft. Bij de andere muizen is de standaard kooiverrijking aanwezig.

Voor het dermatitis model is net als bij donor muizen sprake van standaard kooiverrijking, daarnaast zullen de dieren vanaf challenge wanneer ziekteverschijnselen kunnen verschijnen zeer regelmatig gecheckt worden om ongerief tot een minimum te beperken.

## Herhaling en duplicering

### E. Herhaling

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

## Huisvesting en verzorging

### F. Huisvesting en verzorging

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

Nee

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

### G. Plaats waar de dieren worden gehuisvest

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

Artritis inductie en de ontwikkeling van ontsteking bij dermatitis en transplantatie geven ongerief bij de dieren. Echter het toepassen van pijnstillers bij deze dieren zal het immuunsysteem beïnvloeden<sup>19</sup>. Het is bekend dat NSAIDs de ontstekingsreactie direct beïnvloeden en daarmee het ziekte model nadelig beïnvloeden. Maar ook het gebruik van opioïden kan de immunreactie beïnvloeden. Buprenorfine wordt vaak beschreven als een veilig alternatief met weinig effect op het immuunsysteem, echter ook buprenorfine kan de inductie van artritis nadelig beïnvloeden in sommige modellen, aangezien voor de modellen die gebruikt worden in deze aanvraag het effect van buprenorfine niet voldoende onderzocht is zal dit niet worden toegepast. Aangezien immunologische parameters bepalen zijn voor de uitkomsten van het onderzoek is het in deze dieren net mogelijk pijnstilling toe te passen.

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

Scheren en sensibiliseren van de dieren voor dermatitis zal onder anaesthesie plaatsvinden

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

Welke eventuele andere vormen van welzijnsaantasting worden voorzien?

Het ontwikkelen van dermatitis zal aanleiding zijn voor het ontwikkelen van ongerief. Het 1. ontwikkelen van anafylactische reacties in het dermatitis model zijn niet beschreven.

2. Handeling van de dieren meerdere malen per week ten behoeven van artritis score

Geef aan wat de mogelijke oorzaken hiervan zijn.

1. Ontsteking van de huid geeft irritatie en mogelijk jeuk.

2. Handeling geeft stress, echter het mogelijk ongerief van de artritis maakt vaker hanteren van de dieren noodzakelijk

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.

Voor de artritis score geldt een maximum score van 16 per dier. Ieder poot kan een score van 4 punten halen. Score 1 matige roodheid en zwelling aan 1 teen of de poot. Score 2 roodheid en zwelling aan de poot of aan maximaal 2 tenen. Score 3: roodheid en zwelling aan de poot en maximaal 3 tenen of milde zwelling van de poot en maximaal 4 tenen. Score 4: roodheid en zwelling aan zowel de poot als 4 tenen.

Een score van 12 wordt beschouwd als een humaan eindpunt.

Voor het dermatitis model wordt gekeken naar het ontwikkelen van dermatitis, duidelijke jeuk (continue krabben) en het openkrabben van de huid worden aangehouden als humaan eindpunt.

Naast model specifieke humane eindpunten wordt ook gekeken naar algemeen welbevinden van de dieren, op basis duidelijke veranderingen in uiterlijk, gewicht of gedrag zullen de dieren worden geuthenaseerd. Hierbij wordt gelet op bol zitten, roodheid rond de ogen en lusteloosheid voor een periode van > 24 uur wordt beschouwd als humaan eindpunt. In het geval van een indicatie van gewichtsverlies worden de dieren gewogen en bij >15% gewichtsverlies in 2 dagen is het HEP bereikt..

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

In het geval van artritis is het te verwachten aantal dieren dat het HEP bereikt ongeveer 10%

In het geval van dermatitis is het ontwikkelen van de ziekte gelijk aan het bereiken van het HEP in dit geval zal tussen de 25 en maximaal 70% van de dieren het HEP bereiken (afhankelijk van de effectiviteit van de therapie).

Voor donor dieren is niet te verwachten dat het HEP bereikt wordt.

## 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.

Artritis model: 25% licht, 75% van de dieren zullen tot matig ongerief hebben

Dermatitis model: 56% licht ongerief en in maximaal 44% van de dieren tot matig ongerief

## Einde experiment

### L. Wijze van doden

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

Nee

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

Na afloop van het experiment worden de immuun relevante organen geïsoleerd uit de dieren voor verder analyses.

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

Nee > Beschrijf de euthanasiemethode en onderbouw de keuze hiervoor.

Ja





> Retouradres Postbus 20401 2500 EK Den Haag

Universiteit Utrecht

Postbus 12007

3501 AA UTRECHT



**Centrale Commissie  
Dierproeven**

Postbus 20401

2500 EK Den Haag

centralecommissiedierproeven.nl

0900 28 000 28 (10 ct/min)

Info@zbo-ccd.nl

**Onze referentie**

Aanvraagnummer

AVD108002016467

**Bijlagen**

1

**28 APR. 2016**

Datum

Betreft Beslissing aanvraag projectvergunning Dierproeven

Geachte [REDACTED]

Op 15 maart 2016 hebben wij uw aanvraag voor een projectvergunning dierproeven ontvangen. Het gaat om uw project "Nieuwe immuuntherapie voor chronische ontstekingen" met aanvraagnummer AVD108002016467. Wij hebben uw aanvraag beoordeeld.

Op 19 april 2016 heeft u uw aanvraag aangevuld. U heeft naar aanleiding van door ons gestelde vragen uw NTS aangepast en uw aanvraag verhelderd op het gebied van aantallen dieren, te gebruiken geslachten, verfijning van dierproeven en hergebruik van dieren. De vragen zijn afdoende beantwoord.

### **Beslissing**

Wij keuren uw aanvraag goed op grond van artikel 10a van de Wet op de Dierproeven (hierna: de wet). Hierbij gelden de voorwaarden zoals genoemd in de vergunning. De specifieke voorwaarde is gesteld omdat de CCD het van belang acht dat beide geslachten in gelijke aantallen gebruikt zullen worden om het aantal in voorraad gedode dieren te verminderen.

De algemene voorwaarde betreffende de afstemming met de IVD is gesteld om onnodig gebruik van dieren in experimenten te voorkomen. De algemene voorwaarde betreffende artikel 10, lid 1 sub a 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 "Nieuwe immuuntherapie voor chronische ontstekingen" starten. De vergunning wordt afgegeven van 1 mei 2016 tot en met 30 april 2021. Deze termijn is anders dan in uw aanvraag, omdat een vergunning een maximale looptijd van 5 jaar heeft.

Overige wettelijke bepalingen blijven van kracht.

### **Procedure**

Bij uw aanvraag heeft u een advies van de Dierexperimentencommissie DEC Utrecht gevoegd. Dit advies is opgesteld op 8 maart 2016. Bij de beoordeling van uw aanvraag is dit advies betrokken overeenkomstig artikel 10a, lid 3 van

de wet.

Wij kunnen ons vinden in de inhoud van het advies van de Dierexperimentencommissie. Dit advies van de commissie, nemen wij over, inclusief de daaraan ten grondslag liggende motivering, met toevoeging van enkele algemene voorwaarden. Het DEC-advies en de in de bijlage opgenomen beschrijving van de artikelen van de wet- en regelgeving zijn de grondslag van dit besluit.

#### **Bezwaar**

Als u het niet eens bent met deze beslissing, kunt u binnen zes weken na verzending van deze brief schriftelijk een bezwaarschrift indienen. Een bezwaarschrift kunt u sturen naar Centrale Commissie Dierproeven, afdeling Juridische Zaken, postbus 20401, 2500 EK Den Haag.

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

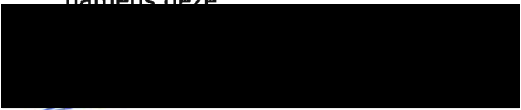
Bezwaar schorst niet de werking van het besluit waar u het niet mee eens bent. Dat betekent dat dat besluit wel in werking treedt en geldig is. U kunt tijdens deze procedure een voorlopige voorziening vragen bij de Voorzieningenrechter van de rechtbank in de woonplaats van de aanvrager. U moet dan wel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

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

#### **Meer informatie**

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

Centrale Commissie Dierproeven  
namens deze:

  
mr. drs. H.M. van der Gaag-Halbertsma  
plv Algemeen Secretaris

#### **Bijlagen:**

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

## **Projectvergunning**

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

Verleent de Centrale Commissie Dierproeven aan

Naam: Universiteit Utrecht

Adres: Postbus 12007

Postcode en plaats: 3501 AA UTRECHT

Deelnemersnummer: 10800

deze projectvergunning voor het tijdvak 01 mei 2016 tot en met 30 april 2021, voor het project "Nieuwe immuuntherapie voor chronische ontstekingen" met aanvraagnummer AVD108002016467, volgens advies van Dierexperimentencommissie DEC Utrecht. De functie van de verantwoordelijk onderzoeker is Onderzoeker.

De aanvraag omvat de volgende bescheiden:

- 1 een aanvraagformulier projectvergunning dierproeven, ontvangen op 15 maart 2016
- 2 de bij het aanvraagformulier behorende bijlagen:
  - a Projectvoorstel, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 april 2016;
  - b Niet-technische Samenvatting van het project, zoals ontvangen per digitale indiening op 19 april 2016;
  - c Advies van dierexperimentencommissie d.d. 8 maart 2016, ontvangen op 15 maart 2016.
  - d Uw aanvullingen zoals ontvangen op 19 april 2016.



| Naam proef  | Diersoort/ Stam                          | Aantal dieren | Ernst                        | Opmerkingen                             |
|---|--|---------------|------------------------------|---|
| In vitro kweek van [redacted] en analyse van fenotype en functie                                      | Muizen (Mus musculus) / WT en [redacted] | 780           | 100%<br>Licht                | 630 WT, 150 transgenen                  |
| [redacted] therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten_Artritis                           | Muizen (Mus musculus) /                  | 3726          | 49%<br>Matig<br>51%<br>Licht | 1296 donordieren<br>2430 artritisdieren |
| [redacted] therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten_dermatitis                         | Muizen (Mus musculus) /                  | 96            | 44%<br>Matig<br>56%<br>Licht |   |
| [redacted] therapie in chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten_Transplantatie model               | Muizen (Mus musculus) /                  | 126           | 60%<br>Matig<br>40%<br>Licht |   |
| Ontwikkelen van een [redacted] vaccin voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten_Artritis model | Muizen (Mus musculus) /                  | 2544          | 40%<br>Matig<br>60%<br>Licht | 1200 donordieren<br>1344 artritisdieren |
| Ontwikkelen van een [redacted] vaccin voor chronische (auto-immuun) ontstekingsziekten)_dermatitis    | Muizen (Mus musculus) /                  | 1350          | 15%<br>Matig<br>85%<br>Licht | 900 donordieren<br>450 dermatitisdieren |

#### Voorwaarden

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

Specifieke voorwaarden:

- Voor de experimenten beschreven in bijlage 1 (In vitro kweek van [redacted] en analyse van fenotype en functie) zullen zowel mannelijke als vrouwelijke dieren gebruikt worden, de IvD houdt hier toezicht op bij de werkprotocollen van de individuele experimenten zodat aan het einde van de looptijd van het

project de geslachtsverhouding op 50/50 uitkomt. Wanneer na het uitvoeren van meerdere / een aantal individuele experimenten gedurende een periode van 2 jaar blijkt dat hier niet aan kan worden voldaan (omdat levering van de geslachten afhankelijk is van de leverancier), zal dit gemeld worden aan de CCD, zodat zij deze voorwaarde mogelijk kunnen herzien of intrekken.

- In bijlage 2 heeft u niet aangegeven of de dieren die hergebruikt worden wel/niet eerder ernstig ongerief hebben ondervonden. Aangezien dit wettelijk vereist is, gaan wij ervan uit dat u hier rekening mee houdt bij de uitvoer van uw experimenten.

**Algemene voorwaarden:**

- 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 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.